

UNTERSUCHUNGEN ZUR REPLIKATION
VON ADENOVIRUS TYP 2 DNA

Theresia Reiter

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548314_0005

UNTERSUCHUNGEN ZUR REPLIKATION VON ADENOVIRUS TYP 2 DNA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians Universität München

vorgelegt von
Theresia Reiter
München 1980



1. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 1. August 1980

婦女能頂半边天

毛澤東

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1977 bis März 1977 am Institut für Genetik der Universität zu Köln und von Juni 1977 bis Mai 1980 am Institut für Biochemie der Universität München unter Leitung von Herrn Professor Dr. E.-L. Winnacker ausgeführt.

Herrn Professor Dr. E.-L. Winnacker danke ich für das Interesse und die Unterstützung, die er dieser Arbeit und mir persönlich zuteil werden ließ.

Frau Ilse Pfitzinger und Frau Brigitte Dietl danke ich für ihre ausgezeichnete, geschickte und zuverlässige Mitarbeit bei vielen IN VITRO-Replikationsversuchen.

Ferner möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen danken, die es ermöglichten, daß diese Arbeit in freundlicher Atmosphäre entstehen konnte.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeine Einführung	1
1.2 Struktur des viralen Cores	2
1.3 Struktureigenschaften der viralen DNA	3
1.4 Genetik der Adenovirus-Replikation	6
1.5 Replikation der Adenovirus-DNA	10
1.6 Modell der Adenovirus-DNA-Replikation	11
1.7 Initiation der Adenovirus-DNA-Replikation	13
1.8 IN VITRO-Replikationssysteme	15
1.9 Aufgabenstellung	17
2. Material	18
2.1 Abkürzungen	18
2.2 Zellen	19
2.3 Virusmaterial	19
2.4 Seren	19
2.5 Chemikalien und andere Materialien	19
2.6 Lösungen	22
3. Methoden	24
3.1 Zellkulturen	24
3.2 Virusvermehrung von Adenovirus Typ 2 (Ad 2), Ad 5 und der Mutante H2 ts214 auf HeLa-Zellen in Einschicht- und Suspensionskulturen	24
3.2.1 Virusvermehrung in HeLa-Einschichtkulturen	24
3.2.2 Virusvermehrung in Suspensionskulturen	26
3.3 Plaquetest von Ad 2 und H2 ts214	26
3.4 Plaquereinigung	27
3.5 Restriktionsendonukleasen	27
3.5.1 Reinigung der Restriktionsendonuklease Sma ^I aus <u>Serratia marcescens</u>	27
3.6 Fragmentierung von Adenovirus DNA mit Restriktionsendonukleasen	28
3.7 Flachgelelektrophorese von Adenovirus DNA und Ad2 DNA-Fragmenten	31

3.8	Gelelektrophorese von Adenovirus DNA-Restriktions- fragmenten auf Agarose-Polyacrylamid-mischgelen	31
3.8.1	Trennung von Ad DNA-Restriktionsfragmenten auf gemischten Agarose-Polyacrylamidgelen	32
3.8.2	Strangtrennungen von Ad DNA-Restriktionsfragmen- ten auf gemischten Agarose-Polyacrylamidgelen Restriktionsfragmenten durch CsCl-Stufengradienten- tanzentrifugation	32
3.9	Reinigung und Konzentration von Ad DNA-Restriktions- fragmenten durch CsCl-Stufengradientenzentrifugation	34
3.10	BND-Cellulose-Chromatographie von Adenovirus DNA	34
3.11	DNA-Synthese in Ad 2- und H2 ts214-infizierten HeLa- Zellen	35
3.11.1	"Upshift-" und "downshift-"Experimente	35
3.11.2	Pulsmarkierung viraler DNA in Ad 2- und H2 ts214-infizierten HeLa-Zellen	35
3.11.3	"Puls-chase"-Experimente	36
3.12	Isolierung von pulsmarkierter viraler DNA aus infizierten HeLa-Zellen	36
3.12.1	Analyse der pulsmarkierten DNA durch Sedimen- tation im alkalischen Sucrosegradienten	36
3.12.2	Isolierung viraler DNA aus Ad 2- und H 2 ts214- infizierten HeLa-Zellen	37
3.13	Extraktion viraler DNA aus Viruspartikeln	37
3.13.1	Extraktion eines DNA-Protein-Komplexes, der nur das terminale Protein enthält	37
3.13.2	Extraktion proteinfreier DNA	38
3.14	Adenovirus DNA-Replikation IN VITRO	38
3.14.1	Isolierung von Zellkernen aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen	38
3.14.2	Präparation von Kernextrakten	39
3.14.3	Standardtest für die DNA-Replikation IN VITRO	39
3.14.4	Bestimmung der Geschwindigkeit der Ad 2 DNA- Replikation	40
3.15	DNA-Synthese in isolierten Zellkernen aus Ad 2-infizier- ten HeLa-Zellen	40
3.15.1	Isolierung von Zellkernen aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen	40
3.15.2	Standardbedingungen für die DNA-Replikation in isolierten Zellkernen	41

4. Ergebnisse	43
4.1 Untersuchungen der Mutante H2 ts214	43
4.1.1 Vergleichender Plaquetest auf HeLa- und 293-Zellen	43
4.1.2 Wachstum von H2 ts214 bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur	44
4.1.3 Virale DNA-Synthese nach Temperaturerhöhung auf restriktive Bedingungen	47
4.1.4 H2 ts214 ist eine Initiationsmutante	49
4.1.5 Initiation der DNA-Replikation nach Temperaturerniedrigung auf 32°C	51
4.1.6 Charakterisierung der neusynthetisierten DNA nach Temperaturerniedrigung auf 32°C	51
4.1.7 Lokalisierung der Replikationsursprungsorte auf dem viralen Genom	55
4.1.8 Analyse der Strangzugehörigkeit von neu eingebauter Radioaktivität an den Replikationsursprungsorten	58
4.2 DNA-Synthese IN VITRO	62
4.2.1 Abhängigkeit der Aktivität von der Salzkonzentration	62
4.2.2 Optimaler Zeitpunkt für das Ernten der Zellkerne	66
4.2.3 Einfluß von Hydroxyharnstoff	68
4.2.4 Optimierung der Bedingungen für die DNA-Replikation IN VITRO	70
4.2.5 Produkt der DNA-Synthese	79
4.2.5.1 Analyse der IN VITRO synthetisierten DNA durch Sedimentation im alkalischen Sucrosegradienten	81
4.2.5.2 Analyse der IN VITRO synthetisierten DNA durch Fragmentierung mit Restriktionsenzymen	81
4.2.5.3 Lokalisierung der Replikationsursprungsorte	83
4.2.5.4 Analyse der Strangzugehörigkeit von neu eingebauter Radioaktivität	85
4.2.6 Exogene DNA dient als Matrize für die DNA-Synthese IN VITRO	90
4.2.7 Verwendung von Mausadenovirus FL-DNA als Matrize für die DNA-Replikation IN VITRO	90
4.2.8 Bedeutung des terminalen Proteins für die DNA-Replikation IN VITRO	95
4.2.9 Stimulierung der DNA-Replikation mit Diadenosin 5', 5'''-p ₁ p ₄ -tetraphosphat (Ap ₄ A)	98
4.2.10 Hemmung der DNA-Replikation IN VITRO	103
4.2.10.1 Hemmung durch Methylen-bis-Adenosindiphosphat	103
4.2.10.2 Hemmung durch den cis-Dichlorodipeptidester-platin(II)-Komplex <u>cis</u> -Cl ₂ Pt(GlyGlyOEt) ₂	106
5. Diskussion	109
6. Zusammenfassung	125
7. Literaturverzeichnis	126

1. EINLEITUNG

1.1 Allgemeine Einführung

Die Komplexheit von Säugetierzellen, die etwa 10^7 Gene enthalten, macht es sehr schwierig, an ihnen molekulare Reaktionen der DNA-Synthese sowie ihrer Regulation zu untersuchen. Es werden daher bevorzugt bakterielle oder tierische Viren, die über kleinere Genome verfügen, für solche Untersuchungen in prokaryotischen und eukaryotischen Systemen verwendet. Das genetische Material der Adenoviren hat mit einem Molekulargewicht von $20 - 25 \times 10^6$ Daltons die Kapazität, um für 30 - 40 Proteine zu kodieren. Dennoch ist die virale DNA-Replikation zum überwiegenden Teil von Enzymen der Wirtszelle abhängig. Da Adenoviren überdies in Zellkernen von Säugerzellen in engster Nachbarschaft mit der chromosomalen DNA replizieren, stellen sie ein attraktives System für molekularbiologische Untersuchungen sowohl der Säugerzelle als auch des Virus dar. Für experimentelle Untersuchungen bieten Adenoviren den Vorteil, daß der sog. produktive oder lytische Infektionszyklus, in dem es zur Bildung von Viruspartikeln kommt, in zwei definierte Phasen, eine "frühe" und eine "späte" Phase zerfällt. In der frühen Phase kommt es zur Bildung einiger weniger viruskodierter Schlüsselproteine, die den zellulären Metabolismus für die Zwecke des Virus verändern. In der späten Phase, definiert durch den Beginn der viralen DNA-Replikation, kommt es zu einer sehr effizienten DNA-Synthese, die von der Synthese der Strukturproteine begleitet wird (Flint, 1979). Die DNA-Synthese erfolgt dermaßen effizient, daß etwa 5×10^5 DNA-Moleküle pro Zelle gebildet werden (Fanning und Doerfler, 1977) und das System damit untersuchbar wird.

Vertreter der Adenoviren wurden erstmals 1953 und 1954 beschrieben (Rowe et al., 1953, Hillemann und Werner, 1954) und sind seitdem in großer Zahl aus dem Respirationstrakt verschiedener Tierarten isoliert worden (Übersichtsartikel: Philipson et al., 1975, Wold et al., 1978). Die menschlichen Adenoviren, von denen 31 Serotypen bekannt sind, wurden nach ihren biologischen und chemischen Eigenschaften in drei Gruppen eingeteilt (Green und Pina, 1964, Pina und Green, 1965, Huebner 1967). Auf Grund der Ergebnisse von Hybridisierungsexperimenten, d.h. Verwandtschaft der Nukleinsäuren, wurde die Einteilung auf 5 Gruppen bezüglich der Homologien der viralen DNA erweitert (Green et al., 1979):

Gruppe	Vertreter	DNA-Homologie in der Gruppe %	DNA-Homol. zu Vertretern von anderen Gruppen %	DNA (% G + C)	Onko- genität
A	12,18,31,	48 - 69	8 - 20	47 - 49	hoch
B	3,7,11,14, 16,21,	89 - 94	9 - 20	49 - 52	mittel
C	1,2,5,6	99 - 100	10 - 16	57 - 59	niedrig
D	8,9,10,13, 15,17,19, 20,22,23, 24,25,26, 27,28,29, 30	94 - 99	4 - 17	57 - 59	niedrig
E	4		4 - 23		niedrig

Tabelle 1: Einteilung der menschlichen Adenoviren nach Green et al. 1979

Allen Adenoviren gemeinsam ist eine charakteristische Morphologie: Sie bestehen aus einem "core" aus DNA mit mindestens 4 assoziierten Proteinen (Maizel et al., 1968, Prage et al., 1968, Russell et al., 1968) und einer ikosaedrischen Hülle mit einem Durchmesser von 65-80 nm, die in 252 Capsomeren angeordnet ist (Philipson und Lindberg, 1974). Durch gelelektrophoretische Untersuchungen konnten für Ad 2 mindestens 9 Strukturproteine identifiziert werden (Maizel, et al., 1968), Anderson et al., 1973, Everitt et al., 1973).

1.2 Struktur des viralen Core's

Durch Behandlung mit Hitze, Aceton, Formamid, 10 % Pyridin oder 5 M Harnstoff kann das virale Core isoliert werden (Philipson und Lindberg, 1974), das aus DNA und den argininreichen Polypeptiden V (Mol. gew. 45.000 Daltons, VII (Mol.gew. 17 000 Daltons) und X (Mol. gew. 4 000 Daltons), die in großer Zahl mit der DNA assoziiert sind, besteht (Winnacker, 1978, Flint, 1979).

Außerdem ist ein viertes Protein mit dem Molekulargewicht 55 000 Daltons speziell an die molekularen Enden der viralen DNA gebunden (Robinson et al., 1973, Robinson und Bellet, 1974, Padmanabhan und Padmanabhan, 1977, Rekosh et al. 1977).

Durch Behandlung von Viruspartikeln mit 0.5 % Sarkosyl erhält man einen Komplex, der neben DNA nur noch Protein VII sowie das terminale Protein enthält (Brown et al., 1975), während durch Behandlung mit 4 M Guanidiniumhydrochlorid auch noch Protein VII abgelöst wird (Robinson und Bellet, 1974).

Im Gegensatz zu Papovaviren, die für ihren Aufbau Histone der Wirtszelle verwenden, scheinen alle vier "Core"-proteine der Adenoviren viruskodiert zu sein (Kedinger et al., 1978). Protein VII, das am besten an die virale DNA bindet, hat bezüglich der Basenzusammensetzung Gemeinsamkeiten mit Histon H4 (Lischue und Sung, 1977).

1.3 Struktureigenschaften der viralen DNA

Proteinfreie DNA, die man durch Behandlung von Viruspartikeln mit proteolytischen Enzymen und anschließender Phenolextraktion gewinnt (Green et al., 1967, van der Eb et al., 1969), stellt sich als lineares, doppelsträngiges Molekül dar, das unter neutralen Bedingungen mit 30.5 S und unter alkalischen Bedingungen mit 34.2 S sedimentiert, was einem Molekulargewicht von 21.8×10^6 Daltons entspricht (Green et al., 1967). Einheitliche Denaturierungsmuster (Doerfler und Kleinschmidt, 1970, Doerfler et al., 1972, Ellens et al., 1974) und einheitliche Fragmentierungsmuster bei Behandlung mit Restriktionsendonukleasen (Mulder et al., 1974) zeigen, daß Ad-DNA nicht zirkulär permutiert ist.

Die komplementären Stränge der doppelsträngigen DNA können gelelektrophoretisch (Sharp et al., 1974, Weingärtner et al., 1976), durch Dichtegradientenzentrifugation im alkalischen CsCl-gradienten (Sussenbach et al., 1973) oder im neutralen CsCl-gradienten, wenn die denaturierten Stränge an Ribopolymere (poly (IG), poly (UG)) gebunden werden (Landgraf-Leurs und Green, 1971, Tibbetts et al., 1974, Ortin et al., 1976), voneinander getrennt werden.

Auf einer Adenoviruskarte wird das Genom als lineares, doppelsträngiges Molekül dargestellt und in Längeneinheiten von 0 - 100 % eingeteilt. Nach einem Vorschlag von Sharp (1977) werden die beiden komplementären

Stränge nach der Richtung, in die sie transkribiert werden, als r- (right) und l- (left) Strang bezeichnet (Abb. 1). Nach dieser Nomenklatur stellt der A-T-reiche Abschnitt der DNA das rechte Ende des viralen Genoms dar (Doerfler und Kleinschmidt, 1970, Mulder et al., 1974) und die DNA-Region, die für die Transformation von Zellen notwendig ist (Gallimore et al., 1974, Graham et al., 1974), das linke Ende.

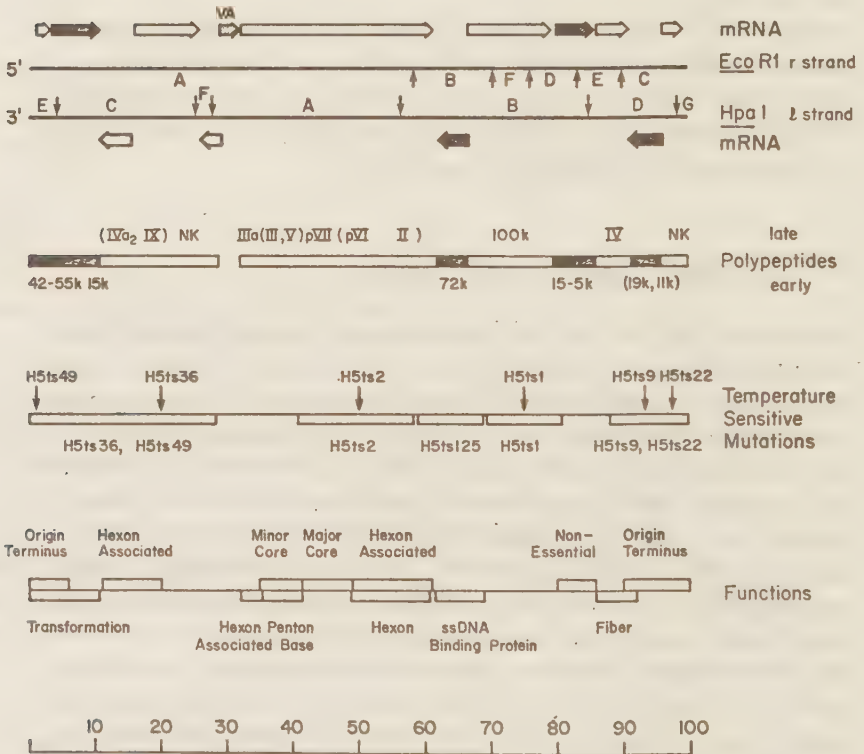


Abb. 1: Topographie des Adenovirusgenoms (übernommen von Flint, 1977)
Erklärung siehe Text (1.1, 1.3, 1.4)

Lineare doppelsträngige DNA kann nach Exonuclease III-Behandlung, die die lineare DNA vom 3'-Ende her abbaut, nicht zirkularisiert werden (Green et al., 1967) und besitzt daher keine terminale Redundanz. Statt

dessen enthält sie eine terminale, invertierte Repetition, die bei Ad 2 eine Länge von 102 Basenpaaren besitzt (Bellet und Younghusband, 1972, Garon et al., 1972, Wolfson und Dressler, 1972, Roberts et al., 1974, Steenbergh et al., 1977, Wu et al., 1977). Diese invertierte, terminale Repetition unterscheidet Adenovirus DNA von anderen linearen, doppelsträngigen DNA-Molekülen, Sie gestattet es nicht, daß im Zuge der DNA-Replikation das virale Genom die Gestalt von zirkulären oder konkatenen Zwischenprodukten annimmt, die bei der Replikation anderer linearer Genome wie bei dem Bakteriophagen λ (Tomizawa und Ogawa, 1968) und T7 (Watson, 1972) obligate Replikationszwischenprodukte darstellen.

Trotzdem konnte Ad-DNA aus Viruspartikeln in einer zirkulären Form nach Behandlung mit 4 M GuHCl isoliert werden (Robinson und Bellet, 1974). Diese zirkulären Formen sind proteasesensitiv, was darauf hindeutet, daß sie nicht durch kovalente Phosphodiesterbindung sondern durch Proteinassoziationen zustande kommen.

Durch Restriktionsanalysen des Komplexes unter Bedingungen, bei denen DNA/Proteinkomplexe nicht (Brown et al., 1975) oder mit reduzierter Mobilität in ein Gel eindringen (Fütterer, 1978, Reiter et al., 1980) wurde bestätigt, daß Ad-DNA mit Protein(en) assoziiert ist. Da der DNA-Proteinkomplex gegen denaturierende und reduzierende Stoffe stabil ist, wird eine kovalente Bindung des Proteins an die DNA angenommen (Robinson et al., 1973, Sharp et al., 1976, Padmanabhan und Padmanabhan, 1977, Steenbergh et al., 1977, Fütterer, 1978).

Es ist anzunehmen, daß das Protein an die beiden 5'-Enden der DNA gebunden ist, da der DNA-Proteinkomplex gegen λ -Exonucleasebehandlung, die spezifisch die 5'-Enden von DNA angreift, resistent ist (Carusi, 1977) und die 5'-Enden der DNA nach alkalischer Phosphatasebehandlung mit Polynukleotidkinase und ^{32}P -ATP nicht radioaktiv markiert werden können (Casey und Davidson, 1977). Über die Art der Bindung und die physikalischen Eigenschaften des Proteins ist nichts bekannt. Das Molekulargewicht in SDS-Polyacrylamidgelen beträgt 55.000 Daltons (Rekosh et al., 1977, Russell and Blair, 1977).

Die Funktion des Proteins ist noch ungeklärt. Modellvorschläge, nach denen das terminale Protein bei der DNA-Replikation eine Rolle spielt (Robinson und Bellet, 1974, Rekosh et al., 1977, Girard et al., 1977) wurden durch Beobachtungen, nach denen replizierende DNA ebenfalls mit Protein assoziiert ist, erhärtet (Girard et al., 1977, Stillmann et al.,

1977, Fütterer, 1978, Robinson et al., 1979, Stillmann und Bellet, 1979, Yamashita et al., 1979, van Wierink et al., 1979).

In Transfektionsexperimenten ist die Infektiosität von Ad-DNA-Proteinkomplexen 3 - 150 mal größer als die von proteinfreier DNA (Sharp et al., 1976, Chinnadurei et al., 1978, Jones and Shenk, 1978, Galos et al., 1979). Es könnte jedoch einfach sein, daß hier die Ad-DNA durch das Protein vor dem Abbau durch zelluläre DNasen geschützt wird.

Auch in zahlreichen anderen Systemen wurden in den letzten Jahren DNA-Proteinkomplexe gefunden, bei denen die Proteine vermutlich kovalent an die DNA gebunden sind. An die 5'-Enden der DNA des Phagen Ø 29 ist ein Protein mit dem Molekulargewicht 29.000 - 32.000 Daltons gebunden, das für Transfektion und DNA-Replikation wichtig ist (Ortin et al., 1971, Harding et al., 1978, Salas et al., 1978). Bei den doppelsträngigen, zirkulären Genomen von SV 40 (Kasamatsu und Wu, 1976), ØX 174 (Eisenberg et al., 1977, Langeveld et al., 1978) und den Plasmiden Col E1 und Col E2 (Blair et al., 1971) wird nach spezifischer Spaltung eines der beiden DNA-Stränge das jeweilige Protein am Replikationsursprung an das 5'-Ende der DNA gebunden. Das so erzeugte Strukturelement könnte eine Bedeutung bei der Aufwicklung superhelikal gewundener DNA Doppelstränge oder als Start- oder Endpunkt einer Replikationsrunde haben. Auch eine Multifunktionalität dieser Enzyme wird diskutiert (Eisenberg et al., 1977).

Auch an das 5'-Ende der RNA von Poliovirus ist ein Protein gebunden, das für die Replikation von Bedeutung ist. (Flanagan et al., 1977, Lee et al., 1977, Nomoto et al., 1977).

1.4 Genetik der Adenovirus-Replikation

Aus Untersuchungen in prokaryotischen Systemen ist bekannt, daß biochemische Methoden alleine nicht ausreichend sind, um über Kontrollmechanismen von viralen Reaktionen Klarheit zu erhalten. Konditional lethale und Deletionsmutanten wurden notwendig, um Fragen der Regulationsmechanismen bei der Biosynthese von Viren zu beantworten.

Da die Inkubationstemperatur leicht zu variieren ist, sind konditional lethale temperatursensitive (ts-) Mutanten für solche Untersuchungen besonders geeignet. Der Unterschied in der Nukleotidsequenz von Wildtyp (wt) und ts-Mutanten besteht häufig in einem einzigen Basenaustausch.

Daher sind ts-Mutanten im Gegensatz zu Deletionsmutanten, bei denen das mutierte Genprodukt völlig funktionslos ist, häufig "leaky", d.h., daß das mutierte Protein noch teilweise Wildtypfunktionen erfüllen kann, weil der Defekt der Mutante unter restriktiven Bedingungen nicht quantitativ ist.

ts-Mutanten von Adenoviren wurden in großer Anzahl isoliert.

(Übersichtsartikel: Ginsberg und Young, 1976, 1977, Flint, 1979). ts-Mutanten, die einen Defekt in der DNA-Replikation zeigen, wurden aus Ad 2 (Kathmann et al., 1976), Ad 5 (Ensinger und Ginsberg, 1972, Wilkie et al., 1973) Ad 12 (Ledinko, 1974, Shiroki und Shimojo, 1974) und Ad 31 (Suzuki und Shimoji, 1971) isoliert, die mindestens 3 verschiedenen Komplementationsgruppen zuzuordnen sind (Winnacker 1978). Man kann deshalb postulieren, daß mindestens 3 viruskodierte Proteine an der DNA-Replikation beteiligt sind.

Die erste Komplementationsgruppe (zur Nomenklatur: Ginsberg et al, 1973) betrifft die Mutanten H2 ts201, H5 ts125, H12 ts275 und H31 tsA13 (Winnacker 1978).

Von diesen Mutanten ist bekannt, daß ihr Defekt in einem Protein mit dem Molekulargewicht 72.000 (Ad 2 und Ad 5) (van der Vliet et al., 1975) oder 60.000 Daltons (Ad 12) (Rosenwirth et al., 1975) lokalisiert ist. Dieses Protein bindet bevorzugt an einzelsträngige DNA (van der Vliet und Levine, 1973, Levine et al., 1974, van der Vliet et al., 1975) und ist für die Initiation und vermutlich auch für die Elongation der DNA-Replikation notwendig (van der Vliet und Sussenbach, 1975, Flint et al., 1976, van der Vliet et al., 1977). Es ist beschrieben, daß das DNA-bindende Protein auch für die DNA-Replikation IN VITRO benötigt wird (Brison et al., 1977, Kedinger et al., 1978, Kaplan et al., 1979, Ariga et al., 1980).

Mutante	thermolabiles Protein	Literatur
H2 ts201	DNA-bindendes Protein	Kathmann et al., 1976 Winnacker, 1978
H5 ts125	"	Ensinger und Ginsberg, 1972 van der Vliet und Sussenbach, 1975 Sussenbach und Kuijk, 1978
H12 tsA275	"	Shiroki und Shimojo 1974 Ariga und Shimojo 1977, 1978
H31 tsA13	"	Suzuki und Shimojo, 1971, 1973
H5 ts36	nicht bekannt	Wilkie et al., 1973
H5 ts149	"	Ginsberg et al., 1974 Williams et al., 1974 Galos et al. 1979
H2 ts206	"	Kathmann et al., 1976
H2 ts214	"	Winnacker, 1978

Tabelle 2: Eigenschaften "früher" Adenovirus ts-Mutanten

Zur zweiten frühen Komplementationgruppe gehören die Mutanten H5 ts36 und H5 ts149 (Winnacker, 1978). Ihr zugehöriges Genprodukt konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Man weiß jedoch, daß sie innerhalb der linken 25 % des viralen Genoms kartieren (Frost und Williams, 1978). Galos et al. (1979) haben den Genort von H5 ts36 in einem Bereich von 18.5 - 22 % ermittelt.

Dieser Bereich liegt außerhalb der bisher bekannten 4 frühen Regionen (Abb.1) und damit auch außerhalb des Bereiches, der für das Tumor-Antigen kodiert. Von den Mutanten ist jedoch beschrieben, daß sie bei restriktiven Bedingungen in der DNA-Replikation defekt sind (Wilkie et al., 1973, Ginsberg et al., 1974). Unter restriktiven Bedingungen wird das Tumor-Antigen in der frühen Phase exprimiert (Williams et al., 1974), es werden aber keine späte RNA und keine späten Proteine synthetisiert (Russell und Skehel, 1974, Berget et al., 1976).

Da diese Mutanten daher alle Charakteristika einer frühen Mutante zeigen, aber außerhalb der bekannten frühen Regionen kartieren, ist zu

postulieren, daß neben den 4 bekannten frühen Regionen mindestens eine weitere existieren muß (Galos et al., 1979).

Im Widerspruch zu den eben beschriebenen Eigenschaften der Mutante H5 ts36 steht die Beobachtung, daß virale DNA in H5 ts36 infizierten Zellen nach Temperaturerhöhung von permissiven auf restriktive Bedingungen noch mindestens 6 Stunden, wenn auch mit verminderter Syntheserate, repliziert wird (Levine et al., 1974, van der Vliet und Susenbach, 1975, Carter und Ginsberg, 1976). Obwohl das Genprodukt von H5 ts36 nicht bekannt ist, gibt es Hinweise, daß es bei der DNA-Replikation in katalytischen Mengen gebraucht wird (Williams et al., 1974, Galos et al., 1979). Wenn das Genprodukt in geringen Mengen gebraucht wird, könnte man sich vorstellen, daß das zum Zeitpunkt der Temperaturerhöhung vorliegende intakte Genprodukt ausreicht, um die DNA-Synthese über mehrere Stunden zu katalysieren.

Die 3. Komplementationsgruppe betrifft die Mutante H2 ts206. Der Defekt dieser Mutante liegt in einer Funktion, die innerhalb der ersten 2 Stunden nach Infektion benötigt wird und daher nicht direkt in die DNA-Replikation involviert ist (Kathmann et al., 1976, Winnacker, 1978).

Neben den ts-Mutanten wurden aus Ad 5 9 Wirtsbereichsmutanten (hr) isoliert, die nicht effizient in normalen, menschlichen Zellen, sondern nur auf Ad 5-transformierten Zellen (293 Zellen) (Graham et al., 1977) wachsen können (Harrison et al., 1977) und 2 Komplementationsgruppen zugeordnet werden konnten. Durch sog. "marker rescue"-Experimente, bei denen der Defekt einer Mutante durch ein definiertes Wildtypfragment komplementiert wird (Arrand, 1978, Frost and Williams, 1978) wurde gezeigt, daß alle hr-Mutanten in der früheren Region I kartieren (Frost und Williams, 1978). hr-Mutanten aus beiden Komplementationsgruppen komplementieren mit H5 ts36 und H5 ts125. Ob zwischen diesen hr-Mutanten und H2 ts206 eine Verwandtschaft besteht, muß noch geprüft werden.

Neben den hier beschriebenen konditional lethalen Mutanten wurden durch IN VITRO-Manipulationen Deletionsmutanten von Adenoviren isoliert (Jones and Shenk, 1978, 1979). Diese Mutanten haben den Vorteil, daß das mutierte Protein völlig funktionslos ist, und die Mutation nicht revertierbar ist. Während konditional lethale Mutanten nur auf Regionen beschränkt sind, die für ein essentielles Protein kodieren, können Deletionsmutanten über den gesamten Genombereich selektioniert werden. Daher können

auch nicht essentielle Gene oder Regionen mit Regulationsfunktion erfaßt werden. Sehr geeignet sind Deletionsmutanten für das Aufstellen von physikalischen Genkarten, da sie leicht und genau kartierbar sind. Daß aus IN VITRO-Translationsversuchen mindestens 6 frühe Proteine bekannt sind (Lewis et al., 1976) zeigt, daß die genetischen Untersuchungen über frühe Genfunktionen noch lange nicht vollständig sind.

1.5 Replikation der Adenovirus-DNA

Unter den üblichen Infektionsbedingungen beginnt die Ad 2- oder Ad 5-DNA-Synthese 6 - 8 Stunden nach Adsorption und erreicht nach 16 - 24 Stunden ein Maximum (Philipson und Lindberg, 1974, Winnacker, 1978, Flint, 1979). Es sind keine virusspezifischen DNA-Polymerasen bekannt (Bolden et al., 1975). Aus Untersuchungen mit den spezifischen Inhibitoren ddTTP und Aphidicolin gibt es Hinweise, daß die zellulären DNA-Polymerasen α und γ an der viralen DNA-Replikation beteiligt sind (Arens et al., 1977, Brison et al., 1977, Frenkel, 1978, van der Vliet und Kwant, 1978, Abboud und Horwitz, 1979).

Virale DNA-Replikation verläuft semikonservativ (Pearson und Hanawalt, 1971, Sussenbach und van der Vliet, 1972, van der Eb, 1973).

Pulsmarkierte, replikative Zwischenformen der Ad-DNA sedimentieren im neutralen Sucrosegradienten schneller als fertige DNA (Burlingham und Doerfler, 1971, van der Vliet und Sussenbach, 1972, Robin et al., 1973, van der Eb, 1973) und enthalten Tochterstränge von unterschiedlicher Länge, die aber nie länger als die Elternstränge sind (Horwitz, 1971, Sussenbach et al., 1973, van der Eb, 1973, Pearson, 1975), wodurch die Bildung von konkatemeren Zwischenformen bei der viralen DNA-Replikation ausgeschlossen wird.

Die replikativen Zwischenformen enthalten ausgedehnte Abschnitte von einzelsträngiger DNA und zeigen im CsCl-gradienten eine höhere Schwebedichte (Horwitz, 1971, Pearson und Hanawalt, 1971, van der Vliet und Sussenbach, 1972, Petterson, 1973, Robin et al., 1973, Sussenbach et al., 1973), die gegen einzelstrangspezifische Nukleasen sensitiv sind (Petterson, 1973, Pearson, 1975).

Durch BND-Cellulose-Chromatographie lassen sich replikative Zwischenformen von doppelsträngiger fertiger DNA abtrennen (Sussenbach et al., 1972, Winnacker et al., 1972, van der Eb, 1973, Horwitz, 1976).

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden im wesentlichen 2 Sorten von replizierenden DNA-Molekülen gefunden:

Doppelsträngige Moleküle mit einer oder (selten) mehreren einzelsträngigen Verzweigungen (Typ I-Moleküle) und lineare Moleküle, die partiell doppel- und partiell einzelsträngig sind (Typ II-Moleküle) (Ellens et al., 1974, Lechner und Kelly 1977). Wie partielle Denaturierungsmuster zeigen, sind im Doppelstranganteil der Typ II-Moleküle beide Genomenden mit etwa gleicher Häufigkeit vertreten (Lechner und Kelly, 1977).

Die Struktur der verzweigten Moleküle deutet darauf hin, daß bei der DNA-Replikation der Elternstrang, der dem entstehenden Strang komplementär ist, verdrängt wird. Aus diesen Beobachtungen leitet sich das folgende Modell der Ad-DNA-Replikation ab.

1.6 Modell der Adenovirus-DNA-Replikation (Abb. 2)

Nach dem Modell von Lechner und Kelly (1977) verläuft die DNA-Replikation in zwei Schritten:

Im ersten Schritt beginnt die Replikation am linken oder rechten Ende des doppelsträngigen Genoms durch sog. "Displacement"-Synthese eines Tochterstranges in der 5' → 3'-Richtung. Dabei wird der parentale Strang, der dieselbe Polarität wie der neusynthetisierte Strang besitzt, verdrängt und stellt nun den Einzelstranganteil des Typ I-Moleküls dar. An den verdrängten Einzelsträngen wird in einem 2. Schritt, der "complementary strand"-Synthese genannt wird, ein 2. Tochtermolekül gebildet, das ein Typ II-Molekül darstellt. Die hier postulierten "panhandle"-Strukturen, die durch intramolekulare Basenpaarung auf Grund der invertierten, terminalen Reiteration gebildet werden können, sind rein hypothetisch. Immerhin entstünden auf diese Weise doppelsträngige Enden, die denen der intakten DNA nicht unähnlich sind und daher von derselben Maschinerie repliziert werden könnten.

Das Modell steht im Einklang mit Versuchsergebnissen über Initiationspunkte und Terminationspunkte der DNA-Replikation:

Durch Pulsmarkierungsversuche konnte gezeigt werden, daß die Termination an beiden molekularen Enden des viralen Genoms erfolgt, wobei der Tochterstrang jeweils zum 3'-Ende des Genoms hin synthetisiert wird (Schil-

ling et al., 1975, Tolun und Petterson, 1975, Horwitz, 1976, Weingärtner et al., 1976, Sussenbach und Kuijk, 1977). Durch entsprechende Temperaturveränderungen konnte DNA-Replikation der ts-Mutanten H5 ts125 (Sussenbach und Kuijk, 1978) und H12 tsA275 (Ariga und Shimojo, 1977, 1978) synchronisiert und gezeigt werden, daß in replizierender DNA die beiden molekularen Enden bevorzugt radioaktiv markiert werden.

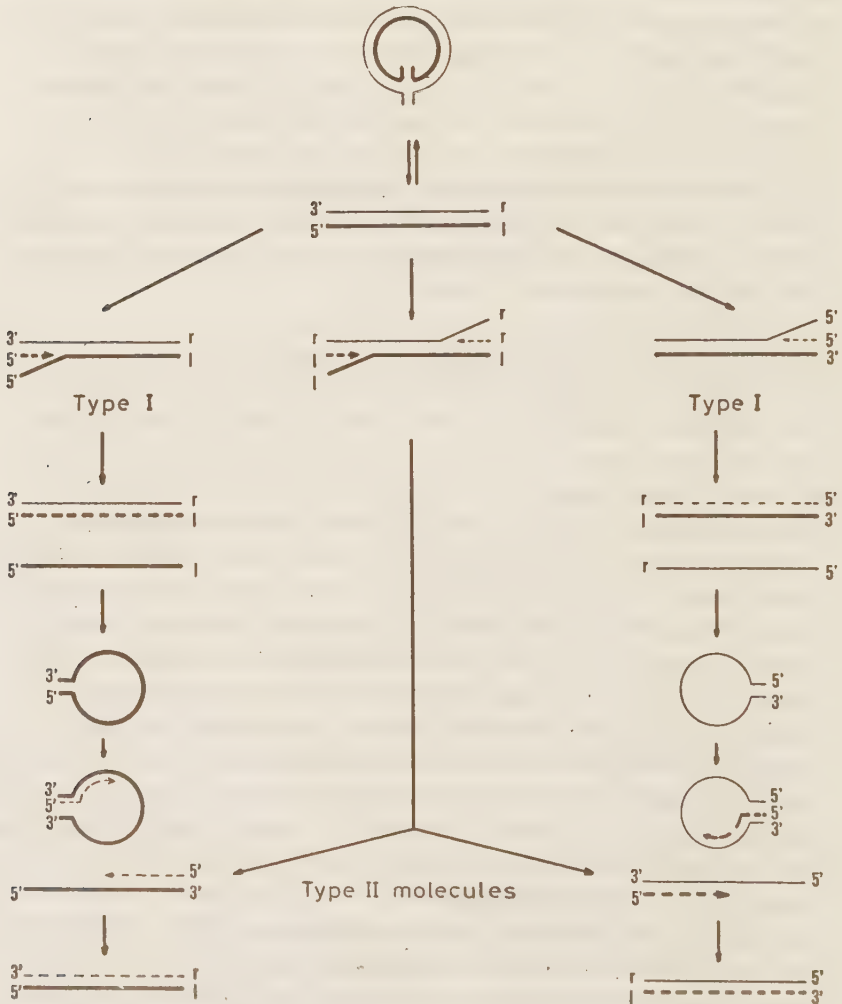


Abb. 2: Modell der Adenovirus DNA-Replikation nach Lechner und Kelly, 1977. Das Modell ist im Text näher beschrieben.

1.7 Initiation der Adenovirus-DNA-Replikation

Der Mechanismus der Initiation der DNA-Replikation ist noch weitgehend ungeklärt. Alle bisher bekannten eukaryotischen DNA-Polymerasen benötigen eine freie 3' OH-Gruppe als "Primer" für die DNA-Synthese (Weissbach 1975, 1977). Bei linearen DNA-Molekülen mit terminaler Redundanz kann dieser Primer über ringförmige oder konkatemere Zwischenstufen vom replizierenden DNA-Molekül selbst zur Verfügung gestellt werden (Tomizawa und Ogawa 1968, Watson 1972). Bei Adenoviren sind solche Zwischenstufen wegen der invertierten terminalen Redundanz nicht möglich.

Verschiedene Modelle zur Initiation der DNA-Replikation umgehen diese Schwierigkeiten:

- a) Zirkularisierung der DNA durch die terminalen Proteine (Robinson und Bellet, 1974):

Zirkuläre DNA-Proteinkomplexe sind als Zwischenprodukte bei der DNA-Replikation von ϕ X 174 (Langeveld et al., 1978), Col E1 (Tomizawa et al., 1977) und SV 40 (Kasamatsu und Wu, 1976) beschrieben. Replizierende Ad-DNA konnte jedoch nie, auch nicht nach sehr kurzen Pulsen von 60 Sekunden als ringförmige Struktur gesehen werden. Falls die zirkulären Formen obligate Zwischenstufen darstellen, müssen sie daher sehr kurzlebig sein.

- b) Eine andere Theorie postuliert die Existenz palindromer Sequenzen am Genomende, so daß das jeweilige 3'-Strangende sich durch intramolekulare Basenpaarung zurückfalten kann und damit zum Primer der DNA-Synthese wird (Abb. 3A) (Cavalier-Smith 1974, Tattersall und Ward, 1976, Wu et al., 1977). Dieses sog. "hairpin"-Modell erscheint wenig überzeugend, da nie neusynthetisierte DNA-Stränge, die länger als das Genom sind, gefunden wurden (Stillmann et al., 1977). Auch konnten durch Sequenzanalysen (Steenbergh et al., 1977, Arrand and Roberts, 1979, Tolum et al., 1979) keine palindromen Sequenzen, die bei diesem Modell gefordert werden, gefunden werden.

- c) Ein drittes Modell wird von Rekosh et al. (1977) vorgeschlagen (Abb. 3B): Ein freies terminales Protein bindet nicht-kovalent an das 3'-Ende eines DNA-Einzelstranges und bindet außerdem ein Molekül Desoxycytidin oder Desoxycytidintriphosphat, dessen freie 3' OH-Gruppe dann als Primer für die DNA-Synthese wirkt. Dieses Modell erscheint deshalb sehr attraktiv, weil an replikativen Formen von Ad DNA ein

1.8 IN VITRO-Replikationssysteme

Durch die Entwicklung von IN VITRO-Systemen konnten verschiedene Genprodukte, die für die DNA-Replikation bei prokaryotischen Organismen notwendig sind, zugeordnet und untersucht werden (Wickner, 1978).

In verschiedenen eukaryotischen Systemen konnte gezeigt werden, daß isolierte Zellkerne aus uninfizierten Zellen (Friedmann und Müller, 1968, Lynch et al., 1970, Brun und Weissbach, 1978) oder aus Ad-infizierten Zellen (Sussenbach und van der Vliet, 1972, van der Vliet und Sussenbach, 1972, Winnacker, 1975) IN VITRO-Systeme darstellen, die in der Lage sind, Desoxyribonukleosidtriphosphate in säureunlösliche, hochmolekulare DNA zu überführen. Für diese IN VITRO-DNA-Synthese konnte gezeigt werden, daß sie nicht auf Reparatursynthese beschränkt ist, sondern tatsächlich Neusynthese von zellulärer DNA (Hershey et al., 1973, Fraser und Hubermann, 1977) oder Ad-DNA darstellt (van der Vliet und Sussenbach, 1972, Winnacker, 1975).

Durch Untersuchungen der DNA-Replikation in isolierten Zellkernen aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen konnten beide Enden des viralen Genoms als Replikationstermini identifiziert werden. Analysen der Strangverteilung der eingebauten Radioaktivität in terminierten viralen DNA-Molekülen zeigten, daß auch unter IN VITRO-Bedingungen die Termination des viralen r-Stranges am linken molekularen Ende des Genoms stattfindet (Weingärtner, 1977). Diese Parallelität der Termination der viralen DNA-Synthese unter IN VIVO-Bedingungen und in infizierten Zellkernen weist auf einen weitgehend gleichen Ablauf der DNA-Replikation in beiden Systemen hin.

Weiter wurden Kernmembrankomplexe aus Ad-infizierten Zellen (Yamashita und Shimojo, 1973, Shiroki et al., 1974, Yamashita und Green, 1974, Yamashita et al., 1975, Ito et al., 1976, Frenkel, 1978) oder lösliche Systeme ohne Kernmembranfraktionen (Arens et al., 1977, Brison et al., 1977, Kaplan et al., 1977, Rho et al., 1977, Yamashita et al., 1977, Arens und Yamashita, 1978) isoliert, die IN VITRO bestimmte Schritte der Ad DNA-Replikation durchführen können. Es konnte gezeigt werden, daß virale DNA in solchen Komplexen vorwiegend mit dem virusspezifischen DNA-bindenden Protein assoziiert ist (Rho et al., 1977, van der Vliet et al., 1977, Arens et al., 1977, Horwitz, 1978, Kedinger et al., 1978).

Auch eine Reihe von Wirtszellenzymen, die mit der DNA-Replikation in den löslichen Systemen assoziiert sind, konnten nachgewiesen werden. In Versuchen mit spezifischen Inhibitoren konnte die Beteiligung von DNA-Polymerase β an der viralen DNA-Replikation ausgeschlossen werden (Arens et al., 1977, Brison et al., 1977). Aus Untersuchungen mit den Inhibitoren Aphidicolin (Ikegami et al., 1978, Wist und Prydz, 1979) und ddTTP geht hervor, daß die zellulären DNA-Polymerasen α (Arens et al., 1977, Frenkel, 1978, Abboud und Horwitz, 1979) und γ (Ito et al., 1976, Arens et al., 1977, Brison et al., 1977, van der Vliet und Kwant, 1978, Abboud und Horwitz, 1979, Longianu et al., 1979) an der viralen DNA-Replikation IN VITRO beteiligt sind.

Daneben wurden noch zelluläre RNA-Polymerasen, DNA-Ligase- und DNA-abhängige ATPaseaktivität in den löslichen Replikationskomplexen nachgewiesen (Arens et al., 1977).

Bei allen diesen Systemen beschränkt sich die DNA-Synthese jedoch auf die Fortsetzung von bereits unter IN VIVO-Bedingungen eingeleiteten Replikationsprozessen, d.h. daß diese Systeme Elongations- und Terminationsschritte durchführen können, aber nicht in der Lage sind, neue Replikationsrunden zu initiieren.

Kürzlich wurden Kernextrakte aus Ad- infizierten HeLa-Zellen beschrieben, die in der Lage sind, exogen zugesetzte virale DNA zu replizieren. Das bedeutet, daß diese Systeme in der Lage sein müssen, auch die Initiationschritte der DNA-Replikation durchzuführen (Challberg und Kelly, 1979, Reiter et al., 1980). Mit Hilfe dieser Systeme sollte es möglich werden, die einzelnen Enzyme und Proteine, die für die virale DNA-Replikation notwendig sind, durch IN VITRO-Rekonstitutionsexperimente zu identifizieren. Bisher konnte gezeigt werden, daß das virale DNA bindende Protein einen notwendigen Faktor für die IN VITRO-DNA-Replikation darstellt (Kaplan et al., 1979, Ariga et al., 1980).

1.9 Aufgabenstellung

Obwohl Adenovirus-DNA-Replikation intensiv untersucht ist (Winnacker, 1978), ist wenig über die Initiation der DNA-Replikation und die hierfür erforderlichen Faktoren bekannt. In 2 Systemen sollten nun Untersuchungen durchgeführt werden, die Beiträge zum Verständnis der Initiation liefern.

Im ersten Abschnitt der Arbeit sollte, um Aussagen über die Replikationsursprungsorte machen zu können, DNA-Replikation mit Hilfe der Mutante H2 ts214 synchronisiert werden. Hierzu war es notwendig, die Mutante bezüglich ihres Wachstumsverhaltens unter permissiven und restriktiven Bedingungen zu untersuchen. Es mußte auch gezeigt werden, daß der Defekt der Mutante durch die entsprechenden Temperaturveränderungen aufgehoben werden konnte.

Nachdem optimale Bedingungen für eine Synchronisation der viralen DNA-Synthese ausgearbeitet waren, sollte nach ^3H -Thymidinpulsmarkierung neu-synthetisierte DNA isoliert, die Initiationsorte ermittelt und mit den Ergebnissen, die über DNA-Replikation an den Mutanten H5 ts125 (Sussenbach und Kuijk, 1978) und H12 ts A275 (Ariga und Shimojo, 1977) bekannt sind, verglichen werden.

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es, ein IN VITRO-System zu entwickeln, das nicht nur die Elongation katalysiert, sondern zur Initiation der DNA-Replikation fähig ist und an den IN VIVO gewonnenen und bekannten Parametern gemessen werden kann.

2. MATERIAL

2.1 Abkürzungen

Ad X	Adenovirus Typ X
Ad X-DNA-C	Adenovirus Typ X-DNA-Proteinkomplex
Ap ₄ A	Diadenosin 5', 5'''-P ₁ , P ₄ tetraphosphat
BND-Cellulose	Benzoylierte-Naphtoylierte-DEAE-Cellulose
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
D	Dalton
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DMAPN	Dimethylaminopropionitril
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA pHX	Äthylendiamintetraessigsäure, mit 3 M NaOH auf pH X eingestellt
EGTA	Äthylenglykol-bis(aminoäthyläther)-N,N'-tetraessigsäure
HEPES pH X	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure, mit 3 M NaOH auf pH X eingestellt
h	Stunde
hpi	Stunden nach Infektion
hr-Mutante	Wirtsbereichs-(<u>host range</u> -)Mutante
H X tsY	<u>temperatursensitive</u> Mutante Nr. Y des menschlichen (<u>human</u>) Adenovirus Typ X
mA	Milliampere
MB-AMP	Methylen-bis-Adenosinmonophosphat
MB-ADP	Methylen-bis-Adenosindiphosphat
min	Minuten
MOI	Multiplizität der Infektion
MW	Molekulargewicht
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge des Lichts von X nm
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-d	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PFU	Plaques bildende Einheiten
PIPES pHX	Piperazin-N,N'-bis(2-Äthansulfonsäure), mit 3 M NaOH auf pH X eingestellt

PMSF	Phenyl-methyl-sulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Svedberg-Konstante
SDS	Natrium-dodecylsulfat
t	Zeit
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris pH X	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan, mit 5 M HCl auf pH X eingestellt
ts	temperatursensitiv
wt	Wildtyp

2.2 Zellen

HeLa-Zellen waren ein Geschenk von Dr. J. Williams, Glasgow;

293-Zellen waren ein Geschenk von Dr. E. Frost, Glasgow.

2.3 Virusmaterial

Adenovirus Typ 2 war ursprünglich von Dr. W. Rowe, NIH, Bethesda, Maryland erhalten worden.

Adenovirus Typ 5 war ein Geschenk von Dr. J. Williams, Glasgow;

Mausadenovirus Typ FL war ein Geschenk von G. Antoine, München.

2.4 Seren

Flow Laboratories: Kalbsserum, foetales Kalbsserum, Pferdeserum.

2.5 Chemikalien und andere Materialien

Folgende Chemikalien wurden von den aufgeführten Firmen bezogen:

Amersham und Buchler, Braunschweig:

^{32}P -Orthophosphat (30.000 - 100.000 mCi/mg), $6\text{-}^3\text{H}$ -Thymidin (22 - 30 Ci/mMol), (Methyl- ^3H -) Thymidin 5'-triphosphat (^3H -dTTP) (30 Ci/mMol)

J.T. Baker Chemical Co, Philipsburg, New Jersey, U.S.A.
Cesium Chloride (CsCl), Glycerin, Methanol, Toluol

Behring-Werke, Marburg:
Antagosan (Trasylo1) (20.000 KIE/ml)

Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, U.S.A.
Hydroxylapatit

Boehringer, Mannheim:
Adenosin-5'-diphosphat (ADP), Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Cytidin-5'-triphosphat (CTP), 2'-Deoxy-adenosin-5'-triphosphat (dATP), 2'-Deoxy-cytidin-5'-triphosphat (dCTP), 2'-Deoxy-guanosin-5'-triphosphat (dGTP), 2'-Deoxy-thymidin-5'-triphosphat (dTTP), Diadenosin-5',5'''-p¹,p⁴ tetraphosphate (Li-Salz) (Ap₄A), Guanosin-5'triphosphat (GTP), Hydroxyharnstoff, Phosphoenolpyruvat, Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel, Thymidin, Uridin-5'-triphosphat (UTP)

Difco-Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.:
Bacto-Pepton, Yeast-Extract

Flow Laboratories, Bonn:
Gentamycin

L'Industrie Biologique Francaise S.A.:
Agarose A 37 (Indubiose)

E.Merck, Darmstadt:
Äthylendinitrilotetraessigsäure (EDTA), Ammoniumperoxydisulfat, Ammoniumsulfat, Arginin, Borsäure, Bromphenolblau, Chloroform, Coffein, Dimethylaminopropionitril (DMAPN), Glucose, Isoamylalkohol, Isopropanol, Magnesiumchlorid, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdodecylsulfat (SDS), Neutralrot, Paraffin, Phenol, Proteinase K aus Pilzen, Trichlor-essigsäure (TCA), Triton X-100.

Packard Instrument Company:
Permablend III

C. Roth, Karlsruhe:

Dithiothreitol

Schwarz und Mann, Orangeburg, New York, U.S.A.:

Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl), Sucrose ultrapure.

Serva, Heidelberg:

Acrylamid, Hydroxyharnstoff, 2-Mercaptoäthanol, N-2-Hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid (HEPES), N,N'-Methylbisacrylamid, Na-Sarkosyl, Piperazine-N,N'-bis(2-ethane sulfonic acid) (PIPES), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Trifluortrichloräthan (Freon 113), Benzoylierte-Naphtoylierte-DEAE-Cellulose (BND-Cellulose).

Visking Dialyseschläuche: Sie wurden, wie bei Englund et al. (1969) beschrieben, vorbehandelt.

Sigma Chemie, München:

Heparin, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Agarose, Streptomycin-sulfat, Ethidiumbromid, Ethylene-glycol-bis(-amino-ethylether)-N,N'-tetraacetic acid (EGTA), Diadenosine 5',5'''-P₁,P₄-tetraphosphate (Ammonium-Salz) (Ap₄A)

Whatman Ltd., Springfield Mill., Maidstone, Kent, U.S.A.:

Glasfilter GF/A und GF/C, DEAE-Cellulose DE 52, Phosphocellulose P11,

Zinsser, Frankfurt:

Quickscint 501

Ap₄A (Natriumsalz), 2,8-³H-Ap₄A (27.9 Ci/mMol),

Methylen-bis-ADP und Methylen-bis AMP waren ein Geschenk von Dr. F.

Grummt, Martinsried bei München,

cis-Cl₂ Pt (Gly Gly OEt)₂ war ein Geschenk von Dr. W. Beck, München,

Leupeptin war ein Geschenk von Dr. G. Kresze, München.

Alle Substanzen waren vom besten käuflichen Reinheitsgrad.

Alle nicht aufgeführten verwendeten Chemikalien wurden von der Firma

E. Merck, Darmstadt bezogen.

2.6 Lösungen

BND-A-Puffer: 250 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA pH 8.

BND-B-Puffer: 1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA pH 8

BND-C-Puffer: 1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA pH 8, 2 % Coffein.

Borat-Puffer: 50 mM Di-Natrium-tetraborat, 20 mM EDTA pH 8.

Dulbecco's Medium: beschrieben bei Dulbecco und Freemann, 1959.

Elektrophoresepuffer (Flachgel): 40 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, pH 8, 0.5 μ g/ml Ethidiumbromid.

Elektrophoresepuffer (Mischgel): (E-Puffer): 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM n-Propylamin, 0.5 % Sarkosyl.

modifiziertes Eagle's Medium: beschrieben bei Winnacker, 1975.

Heparinlösung: 0.1 % Heparin, 1 % Sarkosyl, 10 mM Tris pH 8, 2 mM EDTA pH 8.

hypotonischer HEPES-Puffer: 20 mM HEPES pH 7.4, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT.

isotonischer HEPES-Puffer: 0.22 M Sucrose, 50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT.

hypotonischer PIPES-Puffer: 10 mM PIPES pH 7.5, 5 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$, 1% (= 200 Einheiten) Trasylol, 10 μ M Leupeptin, 0.01 % Triton X-100, 0.5 mM DTT.

isotonischer PIPES-Puffer: 20 mM PIPES pH 7.5, 0.2 M Sucrose, 50 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.01 % Triton X-100, 1 % Trasylol, 10 μ M Leupeptin, 0.5 mM DTT.

Lysispuffer I (Lyse von Zellen auf alkalischen Sucrosegradienten):

0.9 M NaOH, 0.6 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.

Lysispuffer II ("Hirt"-Extraktion): 0.6 % SDS, 20 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA pH 8.

Lysispuffer III (Lyse von Zellkernen auf Sucrosegradienten + Sarkosyl):

4 M GuHCl, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA pH 8, 0.5 % Sarkosyl.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS und PBS-d): beschrieben bei Dulbecco und Vogt, 1954.

PMT pH X: 10 mM Kaliumphosphat pH X, 7 mM 2-Mercaptoäthanol, 0.015 % Triton X-100.

PMT pH X: 1 mM EDTA in PMT-Puffer pH X.

TE-Puffer: 10 mM Tris pH 8, 2 mM EDTA pH 8.

Toluolscintillatorlösung:

- a) für nichtwässrige Proben: Quicksint 501 (Zinsser, Frankfurt)
- b) für wässrige Proben: 50 g Permablend III, 5 l Methanol, 5 l Toluol.

Tris-Salzlösung: beschrieben bei Winocour, 1963.

Versenelösung: 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 8.3 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 0.5 mM EDTA.

3. METHODEN

3.1 Zellkulturen

HeLa-Zellen wurden sowohl in Einschichtkulturen als auch in Suspensionskulturen gezüchtet. Für die Einschichtkulturen diente Dulbecco's Medium als Nährlösung (Dulbecco und Freemann, 1959), während für die Suspensionskultur der Zellen ein modifiziertes Eagles Medium verwendet wurde (Eagle, 1959). Beide Medien waren mit 10 % Kalbsserum komplementiert. Zur Verhinderung von Mycoplasmen-Verunreinigung wurde den Nährlösungen Gentamycin ($50 \mu\text{g/ml}$) zugegeben. Das Passieren von HeLa-Zellen erfolgte wie bei Kathmann (1974) beschrieben.

293 Zellen (Graham et al., 1977, 1978) wurden in Einschichtkulturen gezüchtet. Als Nährlösung wurde Dulbecco's Medium verwendet, das mit 10 % foetalem Kalbsserum komplementiert wurde. Zur Passage wurden die Zellen nach einer Methode von E. Frost (persönliche Mitteilung) einmal mit Versene-Lösung bei Raumtemperatur und anschließend mit Versene-Lösung bei 37°C gewaschen. Bei dieser Behandlung lösen sich die Zellen nach 5 - 10 Minuten von der Unterlage ab. Da 293-Zellen langsamer als HeLa-Zellen wachsen, wurden sie bei einer Passage in einem Verhältnis von 1:2.5 - 1:3 verdünnt. Auf $50 \times 13 \text{ mm}$ Petrischalen wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro Platte angesetzt. Sie waren nach 2 - 3 Tagen konfluent.

3.2 Virusvermehrung von Adenovirus Typ 2 (Ad 2), Ad 5 und der Mutante H2 ts214 auf HeLa-Zellen in Einschicht- und Suspensionskulturen

Ad 2 und Ad 5 wurden nach denselben Methoden gezüchtet. Alle für Ad 2 beschriebenen Methoden gelten daher auch für Ad 5.

3.2.1 Virusvermehrung in HeLa-Einschichtkulturen

Diese Methode wurde zur Produktion von H2 ts214 oder radioaktiv markiertem Virus verwendet.

Zur Produktion von radioaktiv markiertem Virus wurden nahezu konfluente HeLa-Einschichtkulturen in 75 cm² Falconflaschen (5 x 10⁶ Zellen/Flasche) mit Ad 2 (10 - 20 PFU/Zelle) in 2 ml Tris-Salzlösung 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Viruslösung abgegossen, die Zellen einmal mit Tris-Salzlösung gewaschen und nach Zugabe von 40 ml Dulbecco's Medium und 2 % Kalbsserum weitere 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 30 ml Medium abgegossen und ³H-Thymidin (5 - 10 µCi/ml) zugegeben.

Zur Züchtung von ³²P-markiertem Virus wurde 6 hpi das Medium durch eine Mischung aus phosphatfreiem Dulbecco's Medium und Dulbecco's Medium (9:1)-ersetzt und mit ³²P-Orthophosphat (150 - 250 µCi/ml) radioaktiv markiert.

Der Aufschluß der infizierten HeLa-Zellen erfolgte wie beschrieben (Doerfler, 1969, Rosenwirth et al., 1974). Infizierte Zellen wurden 36 - 40 hpi mit Tris-Salzlösung gewaschen, in 1.5 ml 0.02 M Tris (pH8) aufgenommen und bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden entweder dreimal eingefroren und aufgetaut oder nach dem ersten Auftauen mit einem Branson Sonifier (3 x 30 Sekunden/65 mA) beschallt, die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 Minuten, 1000 g, 4°C) und der virushaltige Überstand zweimal mit Trifluortrichloräthan (Freon 113) extrahiert. Die Reinigung dieses Virus-Rohextraktes geschah durch zwei- bis dreimalige CsCl⁺-Gleichgewichtszentrifugation, indem in X ml der Viruslösung X/2 g CsCl gelöst wurden. Diese Lösung wurde zweimal drei Stunden bei 48.000 rpm und 4°C in einer Sorvall Ultrazentrifuge (Modell OTD 50 bzw. OTD 2, vertikaler Rotor TV 865) zentrifugiert. Bei dieser Gleichgewichtszentrifugation bilden die Viruspartikel bei einer Dichte von 1.334 g/cm³ eine weiße Bande. Das Material wurde durch Austropfen geerntet und bei 0 - 4°C aufbewahrt.

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte dadurch, daß 5 µl der radioaktiven Probe auf ein GF/A-Glasfilter (Whatman) aufgetrocknet wurde und die Radioaktivität nach Zugabe von 5 ml Toluolszintillationsflüssigkeit im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Packard) ermittelt wurde.

Zur Vermehrung von H2 ts214 wurden infizierte HeLa-Zellen 4 - 5 Tage bei 32°C inkubiert, mit Tris-Salzlösung (Winocour, 1963) gewaschen, in 2 ml 0.02 M Tris (pH 8) aufgenommen und dreimal bei -20°C eingefroren und bei Zimmertemperatur aufgetaut. Nach Beseitigung von Zelltrümmern durch Zentrifugation wurde der Virus-Rohextrakt bei -80°C aufbewahrt.

3.2.2 Virusvermehrung in Suspensionskulturen

HeLa-Suspensionskulturen in Glasgefäßen wurden bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml mit Ad 2 (10 - 20 PFU/Zelle) infiziert und nach einer Adsorptionszeit von 1 bis 2 Stunden bei einer Zelldichte von $2 - 5 \times 10^5$ Zellen/ml in modifiziertem Eagle's Medium mit 2 % Kalbsserum für 40 bis 48 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (4°C, 1000 g, 15 Minuten) und entweder für Virusgewinnung, wie oben beschrieben, weiterverarbeitet oder nach Ultraschallbehandlung als Virus-rohextrakt für Zellinfektionen bei -80°C eingefroren (Winnacker, 1975).

3.3 Plaquetest von Ad 2 und H2 ts214

Zur Titerbestimmung von Ad 2 und H2 ts214 wurden Plaquetests auf HeLa- und 293-Zellen (Graham et al. 1977, 1978) in 50 mm Petrischalen nach einer von Williams (1970) entwickelten Methode mit kleinen Veränderungen durchgeführt. Annähernd konfluente HeLa-Zellrasen (2×10^6 Zellen/Platte) wurden mit verschiedenen Virusverdünnungen in Tris-Salzlösung inokuliert. Nach sechzig minutiger Adsorption bei 37°C wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit einer Nährlösung aus Dulbecco's Medium, 0.8 % Agarose (Sigma), 2.5 % Pferdeserum, 25 mM $MgCl_2$ und 1 mM Arginin überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen bei 39°C bzw. 10 Tagen bei 32°C wurden die Zellen mit 0.01 % Neutralrot, das in der gleichen Nährlösung gelöst war, angefärbt und nach 12 - 24 Stunden die Plaques gezählt.

Bei der Durchführung der Plaquetests auf 293-Zellen erfolgte die Virusverdünnung in Dulbecco's Medium. Die Nährlösung enthielt statt Pferdeserum 2.5 % foetales Kälberserum.

3.4 Plaquereinigung

Einzelplaques, die bei 39°C (Ad 2) bzw. 32°C (H2 ts214) gewachsen waren, wurden mit einer Pasteurpipette aus dem Agar ausgestanzt, in 1 ml Dulbecco's Medium aufgenommen und dreimal bei -80°C eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut, um intakte Zellen aufzubrechen (Shiroki et al., 1972). Diese Isolate hatten einen Titer von 1×10^3 - 1×10^5 PFU/ml.

3.5 Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonukleasen Bam HI aus Bacillus amyloliquefaciens (Wilson und Young, 1975), Eco RI aus Escherichia coli (Yoshimoro, 1971), und Hpa I aus Haemophilus parainfluenzae (Sharp et al., 1973) wurden von Mitarbeitern des Arbeitskreises E.-L. Winnacker angereichert.

3.5.1 Reinigung der Restriktionsendonuklease Sma I aus Serratia marcescens (C. Mulder, unveröffentlicht)

Der Bakterienstamm Serratia marcescens (Geschenk von W. Doerfler, Köln) wurde in etwa 8 l Flüssigkeitsmedium (10 g Bacto-Pepton/l, 10 g Hefe-Extract/l (Difco), 5 g NaCl/l, 1.8 g D-Glucose/l) bei 30°C bis zu einer optischen Dichte (OD_{660}) von 2.25 gezüchtet.

Alle folgenden Reinigungsschritte wurden bei 0 - 4°C durchgeführt. Die Zellen (etwa 50 g Naßgewicht) wurden durch Zentrifugation geerntet, in 70 ml PMT-Puffer pH 7.0 (10 mM Kaliumphosphat, pH 7.0, 7 mM 2-Mercapto-äthanol, 0.015 % Triton X100) aufgenommen, in Gegenwart von 0.1 mg/ml PMSF 10 x 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt und im Sorvall GSA-Rotor 40 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Dem Überstand wurde unter ständigem Rühren langsam 50 ml Streptomycinsulfat (10 % in PEMT-Puffer, pH 7.0) zugegeben, 15 Minuten weitergerührt und anschließend 30 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Dem Überstand wurde langsam feingepulvertes Ammoniumsulfat bis zur 50 prozentigen Sättigung zugegeben. Dabei wurde der pH-Wert durch Zugabe von einigen Tropfen 10 % NH_4OH bei 7.0 gehalten. Nach Beendigung der Ammoniumsulfatfällung wurde 30 Minuten weitergerührt und der Niederschlag nach einstündiger Zentrifugation bei

10.000 g entfernt. Zum Überstand wurde weiteres Ammoniumsulfat bis zur 80 prozentigen Sättigung gegeben, eine Stunde gerührt und 30 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 8 ml PEMT-Puffer pH 7.0 (1 mM EDTA in PMT-Puffer) aufgenommen, 16 Stunden gegen den gleichen Puffer dialysiert und anschließend auf eine DEAE-Cellulosesäule (1.6 x 15 cm), die mit dem gleichen Puffer äquilibriert worden war, aufgetragen (Durchflußgeschwindigkeit 15 ml/h). Nach dem Waschen der Säule mit 100 ml PEMT-Puffer pH 7.0 erfolgte die Elution mit einem linearen Gradienten (300 ml) aus 0 - 0.6 M NaCl in PEMT-Puffer pH 7.0.

Nach Bestimmung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm wurden die Fraktionen (25 ml), die bei 0.16 - 0.21 M NaCl eluierten, vereinigt, 16 Stunden gegen PEMT-Puffer pH 7.8 (0.16 M NaCl) dialysiert und anschließend auf eine Phosphocellulosesäule (1 x 9 cm), die vorher mit dem gleichen Puffer äquilibriert worden war, aufgetragen (Durchflußgeschwindigkeit 10 ml/h). Nachdem mit 20 ml PEMT-Puffer pH 7.8 (0.16 M NaCl) gewaschen worden war, wurde das Enzym mit einem linearen Salzgradienten aus 0.15 - 0.6 M NaCl in PEMT-Puffer pH 7.8 eluiert.

Durch Fragmentierung von Ad 2-DNA und anschließender Gelelektrophorese wurden die aktiven Sma I-Fraktionen bestimmt. Das Enzym eluierte von 0.20 - 0.30 M NaCl. Zur Abtrennung einer schwachen Exonukleaseaktivität wurden die aktiven Fraktionen auf eine Hydroxylapatitsäule (0.5 x 2 cm) aufgetragen, die mit PMT-Puffer pH 7.0 äquilibriert worden war. Nach dem Waschen der Säule wurde mit einem linearen Salzgradienten von 0 - 0.5 M Kaliumphosphat pH 7.0 in PMT-Puffer pH 7.0 eluiert. Die Endonuklease Sma I eluierte von 0.15 - 0.3 M Kaliumphosphat. Die enzymatischen Fraktionen wurden vereinigt, mit 0.1 % BSA versetzt und gegen 50 % Glycerin in PMT-Puffer pH 7 (50 mM NaCl) dialysiert und bei -20°C aufbewahrt.

3.6 Fragmentierung von Adenovirus-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Fragmentierung von Ad2-DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl 1 - 2 µg DNA mit 5 µl der jeweiligen Restriktionsendonuklease gemischt und unter optimalen Salzbedingungen (Tab. 2a) ein bis zwei Stunden bei 37°C (Hpa I, Bam HI, Eco RI), bzw. 30°C (Sma I) inkubiert. Die Reaktion

wurde durch Zugabe von 20 mM EDTA, pH 8 gestoppt, die Proteine durch Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernt und die Fragmente durch Dialyse gegen geeignete Puffer zur weiteren Aufarbeitung vorbereitet. Die Bedingungen für optimale Aktivität der in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind nachfolgend aufgeführt:

Restriktionsenzym	Ansatzzusammensetzung
HpaI	10 mM Tris pH 7.8 50 mM NaCl 10 mM MgCl ₂
Eco RI	20 mM Tris pH 7.8 50 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM 2-Mercaptoäthanol
Bam HI	wie Eco RI
Sma I	30 mM Tris pH 9.0 5 mM MgCl ₂ 15 mM KCl

Tabelle 2a: Salzbedingungen für die Fragmentierung von Ad 2-DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen.

In Abbildung 4 sind Anzahl, Größe und Position der spezifischen Ad 2-, Ad 5- und Ad FL-Restriktionsfragmente dieser 4 Enzyme zusammengestellt.

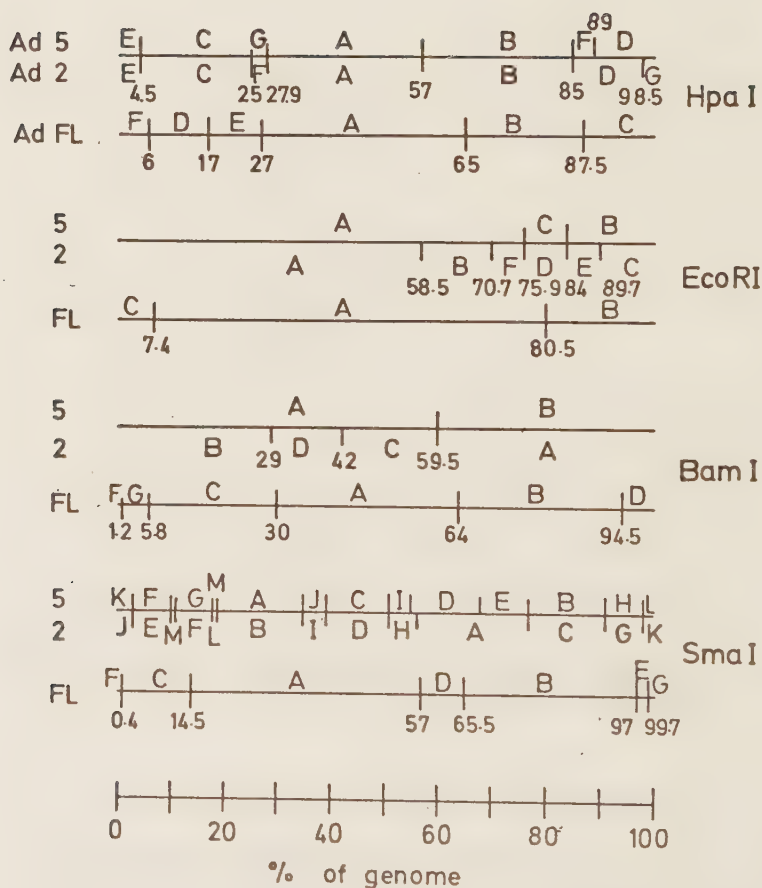


Abb. 4: Fragmentierungskarte der Ad 2-, Ad 5- und Ad FL-DNA für vier verschiedene Restriktionsendonukleasen (V.Mautner und R.Cortini, persönliche Mitteilung, Larsen et al., 1979).

3.7 Flachgelelektrophorese von Adenovirus DNA und Ad 2 DNA-Fragmenten

Der Nachweis spezifischer Restriktionsendonukleasen in fraktionierten Bakterienlysaten erfolgt durch gelelektrophoretische Trennung der Restriktionsfragmente auf Agarose-Flachgelen (Sharp et al., 1973). Von verschiedenen Säulenfraktionen wurden 5 µl Aliquots entnommen und mit jeweils 2 µg Ad 2-DNA unter den in Abschnitt 3.6 beschriebenen Bedingungen inkubiert. Nach einer Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion wurde die Probe mit 10 % Rohrzucker und 0.001 % Bromphenolblau versetzt. Bis zu 50 µl der Probe konnte in die Tasche eines Flachgels aufgetragen werden. Das Gel (1 % Agarose, (Sigma)) und der Elektrophoresepuffer (Hayward und Smith, 1972) enthielten 40 mM Tris pH 8, 5 mM Na-acetat, 1 mM EDTA pH 8, und 0.5 µg / ml Ethidiumbromid. Die Elektrophorese wurde für 4 - 5 Stunden bei 60 V und Raumtemperatur durchgeführt.

Diese Methode wurde auch zur Reinheitsprüfung der Ad-DNA-Proteinkomplexe angewandt. Im Gegensatz zu proteinfreier DNA kann unter den beschriebenen Bedingungen Ad DNA-Proteinkomplex nicht in das Gel eindringen, sondern bleibt auf der Geloberfläche liegen (Brown et al., 1975, Girard et al., 1977, Rekosh et al., 1977).

3.8 Gelelektrophorese von Adenovirus DNA-Restriktionsfragmenten auf Agarose-Polyacrylamid-Mischgelen.

Für die elektrophoretische Trennung von Ad-DNA-Restriktionsfragmenten und die Trennung der komplementären Einzelstränge von Restriktionsfragmenten wurden Agarose-Polyacrylamid-Mischgele verwendet (Peacock und Dingmann, 1968). Gel und Elektrophoresepuffer (E-Puffer) enthielten 90 mM Tris-Base, 90 mM Borsäure, 3 mM EDTA, 1 mM n-Propylamin und 0.5 % Sarkosyl. Die zylindrischen Mischgele (0.8 x 22 cm) wurden hergestellt wie beschrieben (Peacock und Dingmann 1968).

Eine 22 prozentige Lösung von Acrylamid (Verhältnis Acrylamid : Bisacrylamid 19:1) wurde mit Indubiose, 10 fach konzentriertem E-Puffer und Wasser so gemischt, daß das Gel 0.8 % Agarose und 1.5 % Acrylamid enthielt. Als Polymerisationsstarter diente Ammoniumpersulfat (0.04 %) und als Polymerisationskatalysator wurde 3-Dimethylaminopropionitril (DMAPN) (0.32 %) zugegeben. Nach einer Polymerisationszeit von 1 bis 3 Stunden

wurden die Gele einem Elektrophoresevorlauf von 1 bis 3 Stunden bei 50 V unterworfen (Winnacker, 1975), bevor die Probe (0.2 - 1.5 ml pro Gel) auf das Gel aufgetragen wurde.

3.8.1 Trennung von Ad DNA-Restriktionsfragmenten auf gemischten Agarose-Polyacrylamidgelen.

Die Probe befand sich in zehnfach verdünntem E-Puffer und enthielt 10 % Rohrzucker und 0.001 % Bromphenolblau als Farbmarker. Nach einer Startphase von 60 bis 90 Minuten bei 20 V, in der sich das Probenvolumen im Gel konzentrierte, wurden die Gele in der anschließenden Trennphase für 10 bis 18 Stunden bei einer Spannung von 50 V gehalten. Die Gele wurden in Scheiben von 0.9 mm Dicke geschnitten und jede Scheibe in 0.8 ml 0.1 prozentigem SDS für mindestens 7 Stunden bei 37°C geschüttelt. Das so erhaltene Eluat wurde entweder quantitativ oder bei präparativen Gelen in Aliquots auf Whatman GF/A-Glasfilter aufgetrocknet und die Radioaktivität bestimmt.

Unter den hier beschriebenen Elektrophoresebedingungen unterscheiden sich proteinenthaltende Fragmente von ihren proteinfreien Derivaten durch verminderte Mobilität (Fütterer, 1978, Reiter et al., 1980).

3.8.2 Strangtrennungen von Ad DNA-Restriktionsfragmenten auf gemischten Agarose-Polyacrylamidgelen.

Die Strangtrennung von DNA-Restriktionsfragmenten in die komplementären Einzelstränge erfolgte nach einer von Hayward (1972) für die Auftrennung von Bakteriophagen-DNA entwickelten Methode, die für die Auftrennung von Ad DNA-Fragmenten erweitert wurde (Sharp et al., 1974, Weingärtner et al., 1976).

Einige der bei der Gelelektrophorese unterschiedlich wandernden komplementären Fragmentstränge konnten den intakten, viralen Einzelsträngen zugeordnet werden (Sharp et al., 1974, Weingärtner et al., 1976) (Abb. 5).

Gereinigte Restriktionsfragmente wurden nach der Dialyse gegen zehnfach verdünnten E-Puffer in 0.1 M NaOH (45°C, 15 Minuten) denaturiert und anschließend rasch auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von Rohrzucker (10 %) und Bromphenolblau (0.001 %) wurden maximal 100 µl auf Agarose-Polyacrylamidgele (3.8) aufgetragen und 10 - 14 Stunden bei 4°C einer Span-

nung von 120 V ausgesetzt (Sharp et al., 1974, Weingärtner et al., 1976). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele wie unter 3.8. beschrieben weiterbehandelt.

Für die elektrophoretisch getrennten Stränge von verschiedenen Restriktionsfragmenten wurde von Weingärtner et al. (1976) der relative Thymidingehalt in den getrennten Strängen bestimmt.

Ad 2 DNA



Eco RI - Fragmente



HpaI - Fragmente

Abbildung 5: Zuordnung der elektrophoretisch getrennten Eco RI- und Hpa I-Fragmentstränge zu den Einzelsträngen intakter Ad 2-DNA (nach Sparp et al., 1974, Weingärtner et al., 1976). Die Bezeichnung "slow" (s) bzw. "fast" (f) bezieht sich auf die elektrophoretische Mobilität des jeweiligen Fragmentstranges im Vergleich zum komplementären Fragmentstrang und bezeichnet den jeweils langsam bzw. schnell wandernden Fragmentstrang. Die Bezeichnung der intakten viralen DNA-Einzelstränge mit r ("right") und l ("left") beschreibt die Richtung, in die die beiden Stränge transkribiert werden (Sharp, 1977).

3.9 Reinigung und Konzentration von Ad DNA-Restriktionsfragmenten durch CsCl-Stufengradientenzentrifugation.

In einem Sorvall-Zentrifugenröhrchen (5 ml) wurden 1.2 ml CsCl-Lösung mit einer Dichte von 1.8 g/cm^3 in 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA pH 8 mit 1 ml CsCl-Lösung einer Dichte von 1.4 g/cm^3 überschichtet. Diesem Stufengradienten wurden 2.4 ml Gelscheibeneleuat überlagert. Nach einer Zentrifugation (Rotor AH 650) bei 45.000 rpm und 15°C für 12 - 16 Stunden wurde der Gradient durch Austropfen geerntet und die aktiven Fraktionen, die durch Bestimmung der Radioaktivität ermittelt wurden, gegen zehnfach verdünnten E-Puffer dialysiert.

3.10 BND-Cellulose-Chromatographie von Adenovirus DNA

Die Trennung von doppelsträngiger DNA von DNA mit Einzelstranganteilen wurde mittels BND-Cellulosechromatographie durchgeführt. BND-Cellulose wurde von Serva, Heidelberg bezogen oder wie beschrieben präpariert (Gillam et al., 1967). Proteinfreie, radioaktiv markierte virale DNA wurde nach der Dialyse gegen BND-A-Puffer (250 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA) auf eine BND-Cellulosesäule (0.5 x 2 cm) aufgetragen und mit 6 x 1 ml BND-A-Puffer gewaschen. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte wie beschrieben (Winnacker et al., 1972, van der Eb, 1973). Erst wurde doppelsträngige DNA mit 6 x 1 ml BND-B-Puffer (1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA pH 8) und anschließend DNA, die einzelsträngige Anteile aufwies mit BND-C-Puffer (2 % Coffein in BND-B-Puffer) von der Säule eluiert. Kontrollexperimente zeigten, daß durch diese Methode sowohl die Bindung der DNA an die Säule als auch die getrennte spezifische Elution mit Ausbeuten zwischen 90 und 100 % erfolgten (Levine et al., 1970, Horwitz, 1976, Weingärtner, 1977). Nach Bestimmung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen (1 ml/Fraktion) wurde die doppelsträngige DNA bzw. die DNA mit Einzelstranganteilen mit 2 Volumen Isopropanol in Gegenwart von 0.1 M Na-acetat ausgefällt und nach 12 Stunden bei -20°C durch Zentrifugation in einer Sorvall Superspeed 2B-Zentrifuge (Rotor Typ SS 34) bei 15.000 rpm und 0°C für 45 Minuten sedimentiert.

3.11 DNA-Synthese in Ad 2- und H2 ts214-infizierten HeLa-Zellen

3.11.1 "Upshift"- und "downshift"-Experimente

Petrischalen (50 x 13 mm) mit nahezu konfluenten HeLa-Zellrasen (2×10^6 Zellen/Schale) wurden mit Ad 2 bzw. H2 ts214 in einer Multiplizität von 10 - 20 PFU/Zelle wie beschrieben (3.2.1) (Winnacker, 1975) infiziert und bei 32°C bzw. 39.5°C inkubiert.

Bei "upshift"-Experimenten wurde nach Erreichen des Maximums der viralen DNA-Synthese (42 - 48 hpi) das Medium abgegossen, die Zellen einmal mit auf 40.8°C vorgewärmtem Medium gewaschen und nach Zugabe von 10 ml des vorgewärmten Mediums bei 39.5°C weiter inkubiert.

"Downshift"-Experimente wurde mit infizierten Zellen durchgeführt, die 16 Stunden bei 39.5°C inkubiert oder erst 45 - 48 Stunden bei 32°C und anschließend 4 Stunden bei 39.5°C inkubiert worden waren. Die infizierten Zellen wurden zweimal mit eiskalter Tris-Salzlösung gewaschen und mit 1 ml Dulbecco's Medium (0 - 4°C) überschichtet. Nach 15 minutiger Inkubation bei 0°C wurde jeder Platte etwa 10 ml Dulbecco's Medium, das auf 37°C vorgewärmt war, zugegeben, und die Zellen bei 32°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen erreichten die auf 4°C abgekühlten Zellen in weniger als 2 Minuten eine Temperatur von 32°C und befanden sich für den verbleibenden Rest der Pulszeit bei normalen Temperaturbedingungen.

3.11.2 Pulsmarkierung viraler DNA in Ad 2- und H2 ts214-infizierten HeLa-Zellen.

Zu den angegebenen Zeiten wurde das Medium in den Petrischalen auf 4 ml reduziert, ^3H -Thymidin (75 $\mu\text{Ci/ml}$) zugegeben und 1 Stunde bei 39.5°C bzw. 2 Stunden bei 32°C weiter inkubiert.

Bei "downshift"-Experimenten erfolgte die radioaktive Markierung simultan mit der Temperaturerniedrigung. Nach dem Waschen der Zellen wurde ^3H -Thymidin (75 $\mu\text{Ci/ml}$) dem Dulbecco's Medium zugegeben, in dem die Zellen 15 Minuten bei 0°C inkubiert wurden. Nach Zugabe des auf 37°C vorgewärmten Mediums wurden die Zellen für verschiedene Pulsperioden bei 32°C inkubiert.

Analog erfolgte die Pulsmarkierung der infizierten Zellen häufig simultan mit dem "upshift". In diesem Falle wurden die infizierten Zellen nach Temperaturerhöhung mit 5 ml Dulbecco's Medium und ^3H -Thymidin (75 $\mu\text{Ci/ml}$) für die angegebenen Pulsperioden bei 39.5°C inkubiert.

3.11.3 "Pulse-Chase"-Experimente

H2 ts214- bzw Ad 2-infizierte HeLa-Zellen wurden 45 Stunden bei 32°C inkubiert, 15 Minuten mit ^3H -Thymidin (75 $\mu\text{Ci/ml}$) pulsmarkiert und zweimal mit auf 40.5°C vorgewärmten Medium, dem 0.15 M Thymidin zugesetzt war, gewaschen. Anschließend wurden die infizierten Zellen in Gegenwart von 0.15 M "kaltem" Thymidin für die angegebenen Chaseperioden weiter inkubiert.

3.12 Isolierung von pulsmarkierter viraler DNA aus infizierten HeLa-Zellen.

Die Pulsmarkierung wurde beendet, indem die Zellen dreimal mit eiskalter Tris-Salzlösung gewaschen wurden. Die Zellen wurden direkt auf einem 5 - 20 prozentigen alkalischen Sucrosegradienten lysiert oder virale DNA nach einer modifizierten Methode von Hirt (1967) isoliert.

3.12.1 Analyse der pulsmarkierten DNA durch Sedimentation im alkalischen Sucrosegradienten.

Die Lyse von infizierten Zellen bzw. Zellkernen erfolgte nach der von Kathmann et al. (1976) beschriebenen Methode mit kleinen Veränderungen (Walters und Hildebrand, 1975).

Alkalische Sucrosegradienten in 5 ml Sorvall-Zentrifugenröhrchen bestanden aus einem 0.25 ml Kissen aus 70 % Sucrose in 0.7 M NaCl, 0.3 M NaOH und 5 mM EDTA; 4.4 ml eines 5 - 20 % Gradienten in 0.7 M NaCl, 0.3 M NaOH, 10 mM EDTA und waren mit 50 μl Heparinlösung (0.1 % Heparin, 1 % Sarkosyl in TE-Puffer) überschichtet.

Diese Gradienten wurden mit 10.000 - 20.000 Zellen überschichtet und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 50 μl Lysispuffer

I (0.9 M NaOH, 0.6 M NaCl, 20 mM EDTA) wurden die Gradienten 1 Stunde bei 4°C inkubiert und anschließend 2 Stunden bei 48.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Roter Typ AH 650). Die Gradienten wurden durch Austropfen geerntet, und die Menge an Radioaktivität entweder direkt nach Zugabe von 10 ml Toluol/Methanol-Scintillationsgemisch oder nach TCA-Fällung in 5 ml Toluolscintillationsflüssigkeit bestimmt.

Die TCA-Fällung wurde folgendermaßen durchgeführt:

Zu 100 - 150 µl Probe wurden 4 ml fünfprozentiger, eiskalter Trichlor-essigsäure (TCA), die 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ enthielt, gegeben. Der Niederschlag wurde nach 10 Minuten bei 0°C auf Whatman GF/C-Filter gesammelt, dreimal mit je 5 ml der gleichen TCA-Lösung gewaschen und mit 3 ml Äthanol (96 %) nachgespült. Die Filter wurden bei 90°C getrocknet.

Bei IN VITRO-Replikationsversuchen wurde die Enzymreaktion vor der TCA-Fällung durch Zugabe von 50 µM EDTA gestoppt.

3.12.2 Isolierung viraler DNA aus Ad 2- und H2 ts214-infizierten HeLa-Zellen

Infizierte, pulsmarkierte Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml Lysispuffer II (0.6 % SDS in 0.02 M Tris pH 8 und 0.005 M EDTA pH 8) lysiert und in Gegenwart von Proteinase K (0.2 mg/ml) für zwei Stunden inkubiert und durch Zugabe von 5 M NaCl auf eine Konzentration von 1 M NaCl eingestellt. Nach 10 - 12 Stunden bei 4°C wurde das Lysat für 1 Stunde bei 0°C und 16.000 rpm (Sorvall Rotor Typ SS 34) zentrifugiert. Nach dieser modifizierten Methode zur Trennung von viraler DNA und hochmolekularer zellulärer DNA nach Hirt (1967) befanden sich mehr als 90 % der viralen DNA im "Hirt"-Überstand. Die virale DNA wurde dreimal mit Borat-Puffer gestättigtem Phenol extrahiert und schließlich gegen 6 - 8 l BND-A-Puffer dialysiert.

3.13 Extraktion viraler DNA aus Viruspartikeln

3.13.1 Extraktion eines DNA-Proteinkomplexes, der nur das terminale Protein enthält

Virususpensionen in CsCl-Lösung wurde mit weiterem CsCl und mit Guanidiniumhydrochlorid auf 4 M GuHCl und eine Gesamtdichte von 1.468

g/cm³ eingestellt. Außerdem wurde die Lösung 0.01 % an Sarkosyl gemacht, was unspezifische Wechselwirkungen des DNA-Proteinkomplexes mit den Wänden des Zentrifugenröhrchens zu verhindern scheint (Rekosh et al., 1977). Diese Lösung wurde in der Ultrazentrifuge (vertikaler Rotor Typ TV 865) bei 18°C und 48.000 rpm 16 Stunden zentrifugiert und der Gradient durch Austropfen geerntet. Die DNA-haltigen Fraktionen wurden durch Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung oder durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Die Fraktionen, die DNA-Proteinkomplex enthielten, wurden vereinigt und gegen 10 mM HEPES pH 7.4 und 0.01 % Triton X 100 dialysiert.

3.13.2 Extraktion proteinfreier DNA

Viruspartikel in CsCl-Lösung oder Ad DNA-Proteinkomplex wurden gegen BND-A-Puffer dialysiert und anschließend in Gegenwart von 0.5 % SDS durch zweistündige Inkubation mit Proteinase K (0.2 mg/ml) behandelt. Es folgten zwei Extraktionen mit TE-Puffer gesättigtem Phenol und eine ausgiebige Dialyse gegen 10 mM HEPES, pH 7.4 und 0.01 % Triton X 100. Die DNA-Konzentration wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm ermittelt ($OD_{260} = 1$ entspricht 1 mg DNA).

3.14 Adenovirus DNA-Replikation IN VITRO

3.14.1 Isolierung von Zellkernen aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen

HeLa-Zellen in 2 l Suspensionskulturen wurden bei einer Zelldichte von $3 - 5 \times 10^5$ Zellen/ml mit Ad 2 einer MOI von 50 - 100 PFU/Zelle infiziert. Nach zweistündiger Inkubationszeit wurde eine 2M Hydroxyharnstoff-Lösung zu einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben. Die Zellsuspension wurde 18 - 20 hpi mit etwa der gleichen Menge an unterkühlter Tris-Salzlösung (ca. -10°C) gemischt und die Lösung bei 1.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten bei 0 - 4°C. Das Sediment wurde dreimal mit Tris-Salzlösung gewaschen und in 20 ml hypotonischem HEPES-Puffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT) aufgenommen. Nach 15 Minuten wurden die angeschwollenen HeLa-Zellen in einem Dounce-Homogenisator (Braun Melsungen) durch zehn Auf- und Abbewegungen des Dounce-Kolbens lysiert. Das Homogenisat wurde bei 1.000 g für 5 Minuten abzentrifugiert. X ml Niederschlag wurden in 0.75X ml iso-

tonischen HEPES-Puffer (0.22 M Sucrose, 50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) aufgenommen, so daß die Suspension 45 prozentig an isotonischem Puffer wurde. Aliquots von 0.75 ml wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80^{\circ}C$ aufbewahrt.

3.14.2 Präparation von Kernextrakten

Ein Aliquot (0.75 ml) der eingefrorenen Zellkerne wurde langsam bei $0^{\circ}C$ aufgetaut ($t \sim 1$ Stunde). Nach Zugabe von 5 μl 5 M NaCl wurde die Kernsuspension 1 Stunde bei $0^{\circ}C$ inkubiert. Durch Phasenkontrastmikroskopie wurde festgestellt, daß die Zellkerne bei dieser Behandlung ihre typische Morphologie nicht verändern. Nach 15 minutiger Zentrifugation bei 15.000 g wurde der klare, nicht viskose Überstand mit einer Pasteurpipette abgenommen und bei $0^{\circ}C$ aufbewahrt. Die IN VITRO-DNA-Syntheseaktivität dieser Extrakte war mindestens 24 Stunden stabil.

Die Proteinkonzentration, die nach Lowry et al. (1951) bestimmt wurde, betrug bei Kernextrakten aus infizierten und uninfizierten Zellen zwischen 5 und 10 mg/ml.

3.14.3 Standardtest für die DNA-Replikation IN VITRO

Der bei diesen Arbeiten angewandte Test für die VITRO-DNA-Replikation wurde den von Winnacker (1975) beschriebenen Bedingungen für Ad 2-DNA-Replikation in isolierten Zellkernen mit kleinen Veränderungen übernommen.

Der Standardtest enthält in einem Gesamtvolumen von 0.3 ml:

30 mM HEPES pH 7.4

5 mM $MgCl_2$

5 mM KCl

15 mM Sucrose

15 μM 3H -dTTP (Spezifische Aktivität 1 mCi/mMol (3.7×10^7 Becquerels/mMol))

je 60 μM dATP, dCTP, dGTP

2 mM ATP

1 mM DTT

2.5 μg Ad 2 DNA-Proteinkomplex

75 μl Kernextrakt

Das Reaktionsgemisch wurde bei 30°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Reaktion gestoppt, indem 45 µl des Testansatzes auf 10 µl 0.2 M EDTA pipettiert wurden. Der Einbau von Nukleotiden in DNA wurde als TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.

Zur Isolierung des Reaktionsproduktes wurde das Gemisch in Gegenwart von 0.5 % SDS 2 Stunden mit Proteinase K (0.2 mg/ml) inkubiert. Es folgten 2 Extraktionen mit TE-puffer-gesättigtem Phenol und eine ausgiebige Dialyse gegen 10 mM Tris pH 8 und 1 mM EDTA.

Zur Isolierung des Reaktionsproduktes als DNA-Proteinkomplex erfolgte wie unter 3.13.1 beschrieben durch Zentrifugation in einem CsCl-Dichtegradienten in Gegenwart von 4 M GuHCl und 0.01 % Sarkosyl.

3.14.4 Bestimmung der Geschwindigkeit der Adenovirus DNA-Replikation

^3H -pulsmarkierte DNA wurde mit ^{32}P -markierter Marker-DNA gemischt und mit dem Restriktionsenzym Hpa I fragmentiert. Die Restriktionsfragmente wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf den unterschiedlichen Thymidingehalt der einzelnen Fragmente hin korrigiert und als Funktion der Lage der Fragmente auf dem Ad 2-Genom als relativer Radioaktivitätseinbau dargestellt und auf die Fragmente A/B, die unter den angewandten Gelbedingungen nicht aufgetrennt werden auf ein ^3H zu ^{32}P Verhältnis von 1 bezogen ($^3\text{H}/^{32}\text{P}(\text{AB}) = 1$) (Abb. 13 und 30).

Die Geschwindigkeit der Ad DNA-Replikation wurde ermittelt, indem der relative Radioaktivitätseinbau der beiden Randfragmente Hpa I-E und Hpa I-G auf 1 extrapoliert und durch die Pulszeit dividiert wurde (Bodnar und Pearson, 1980).

3.15 DNA-Synthese in isolierten Zellkernen aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen

3.15.1 Isolierung von Zellkernen aus Ad 2 infizierten HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen in 1 l-Suspensionskulturen wurden bei einer Zelldichte von $2 - 5 \times 10^5$ Zellen/ml mit Ad 2 (50 - 100 PFU/Zelle) infiziert und 18 - 20 hpi mit 1 l einer unterkühlten Tris-Salzlösung gemischt und abzentri-

fugiert (10 Minuten 1000 g).

Die Zellen wurden dreimal mit kalter Tris-Salzlösung gewaschen und anschließend in 20 ml hypotonischem PIPES-Puffer (10 mM PIPES, pH 7.5, 5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 1 % (= 200 Einheiten) Trasylol, 10 µM Leupeptin, 0.01 % Triton X 100, 0.5 mM DTT) aufgenommen. Nach 15 Minuten wurden die Zellen in einem Dounce Homogenisator lysiert (3.14.1) und durch Zugabe von 20 ml 0.6 M Sucrose isotonisch gemacht. Die Zellkerne wurden abzentrifugiert (5 Minuten, 2000 g), zweimal mit isotonischem PIPES-Puffer (20 mM PIPES pH 7.5, 0.2 M Sucrose, 50 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.01 % Triton X 100, 1 % Trasylol, 10 µM Leupeptin, 0.5 mM DTT) gewaschen und die Kerne in 1 Volumen isotonischem PIPES-Puffer resuspendiert. Diese Suspension, die für DNA-Syntheseexperimente eingesetzt wurde, enthielt zwischen 4×10^7 bis 7×10^7 Zellkerne/ml. Durch Phasenkontrastmikroskopie wurde festgestellt, daß die Verunreinigung mit intakten HeLa-Zellen weniger als 1 0/oo betrug.

3.15.2 Standardbedingungen für die DNA-Replikation in isolierten Zellkernen.

Der Standardtest enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl:

- 5 mM MgCl₂
- 25 mM NaCl
- 25 mM KCl
- 2 mM EGTA
- 2 mM ATP
- 4 mM Phosphoenolpyruvat (PEP)
- 10 µg/ml Pyruvatkinase
- je 60 µM dGTP, dCTP, dATP
- 10 µM ³H dTTP (Spezifische Aktivität 1mCi/mMol)
- je 50 µM CTP, GTP, UTP
- 40 µl Zellkerne

Unter diesen Bedingungen blieb der Einbau von ^3H dTMP in säureunlösliches Material 30 Minuten linear. Die Reaktion wurde beendet, indem 5 Volumen 20 mM PIPES, pH 7.5, 5 mM EDTA dem Reaktionsgemisch zugesetzt wurden. Die Zellkerne wurden durch Zugabe von 0.5 % SDS lysiert und mit Proteinase K (0.2 mg/ml) inkubiert, das Lysat auf 1 M NaCl eingestellt und nach 16 Stunden bei 4°C bei 18.000 rpm 30 Minuten zentrifugiert (Rotor Typ SW 56). Nach dieser Trennung von viraler und zellulärer DNA nach Hirt (1967) erfuhr der Überstand eine Phenolextraktion und wurde durch BND-Cellulosechromatographie in doppelsträngige DNA und DNA mit Einzelstranganteilen aufgetrennt.

Zur Isolierung des Reaktionsproduktes ohne Verwendung von proteolytischen Enzymen wurden 3×10^6 Zellen mit Lysispuffer III (4 M GuHCl, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA pH 8 und 0.5 % Sarkosyl) versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Volumen der Suspension mit TE-Puffer verdoppelt und die Lösung auf einem 10 - 30 prozentigen Sucrosegradienten in 1M GuHCl, 0.05 % Triton X 100, 0.05 % Deoxycholat, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA pH 8, 10 % Glycerin gegeben. Nach 16 Stunden bei 4°C wurden diese Gradienten in der Sorvall-Ultrazentrifuge (Rotor AH 627) bei 15°C und 25.000 rpm für 3 Stunden zentrifugiert und durch Austropfen geerntet.

4. ERGEBNISSE

4.1 Untersuchungen der Mutante H2 ts214

Die aus dem Serotyp 2 von menschlichen Adenoviren isolierte Mutante H2 ts214 (Kathmann et al., 1976) sollte in dieser Arbeit näher charakterisiert werden, um sie anschließend in Synchronisationsexperimenten zur Untersuchung der Initiation der viralen DNA-Replikation einsetzen zu können.

Die folgenden Abschnitte beschreiben Wachstumskinetiken unter permissiven und restriktiven Bedingungen, das Verhalten von H2 ts214-infizierten Zellen bei Temperaturveränderung und Charakterisierung neusynthetisierter DNA, deren Replikation nach Temperaturniedrigung auf permissive Bedingungen initiiert wird.

4.1.1 Vergleichender Plaquetest auf HeLa- und 293-Zellen

Zunächst wurde die Infektiosität der Mutante durch Plaquetest bei permissiver Temperatur (32°C) und restriktiver Temperatur (39.5°C) auf HeLa- und 293-Zellen getestet.

293-Zellen sind menschliche, embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen), die mit Ad 5-DNA transformiert sind (Graham et al., 1977, 1978). Sie enthalten vier bis fünf Kopien von den linken 12 % des viralen Genoms und etwa eine Kopie von den rechten 10 %.

Uninfizierte 293-Zellen exprimieren virales Tumor-Antigen und virale Ribonukleinsäuren der frühen Region I, die den Ribonukleinsäuren ähnlich sind, die während der frühen Phase eines produktiven Infektionszyklus nach Infektion mit wt-Virus synthetisiert werden (Graham et al., 1977, Aiello et al., 1979, Berk et al., 1979). Daher können 293-Zellen wahrscheinlich alle trans-wirkenden Funktionen komplementieren, die von der frühen Region I exprimiert werden. Den Nachweis für diese Fähigkeit zur Komplementation erbrachten Harrison et al. (1978) durch Isolierung von Wirtsbereichmutanten, die auf 293-Zellen, nicht aber auf HeLa-Zellen effizient wachsen können. Die Komplementationsgruppe dieser Wirtsbereichmutanten wurden von Frost und Williams (1978) durch sog. "marker rescue"-Experimente kartiert (Graham und van der Eb, 1973, Stow und Wilkie, 1976, Arrand, 1978). Die Mutanten kartieren zwischen 0 und 4.4 %

des viralen Genoms, einem Bereich, in dem die Information für das virale Tumor-Antigen lokalisiert ist (Berk et al., 1979).

Durch regelmäßige Einzelplaqueisolierung (3.4) gelang es, die Infektiosität der Mutante bei nicht permissiven Bedingungen sowohl auf HeLa- als auch auf 293-Zellen bei einem Titer unter 10^4 zu halten (Tab.3).

Da H2 ts 214 unter restriktiven Bedingungen daher auch auf 293-Zellen keine Plaques bildet, kann man ausschließen, daß die Mutation in den linken 12 % des viralen Genoms lokalisiert ist.

Virus	Zelllinie	39.5°C (PFU/ml)	32°C (PFU/ml)	Verhältnis der PFU/ml bei 39.5°/32°C
H2 ts214	HeLa	$< 10^4$	$4 \cdot 10^9$	$< 2.5 \cdot 10^{-6}$
	293	$< 10^4$	$4 \cdot 10^9$	$< 2.5 \cdot 10^{-6}$
Ad 2	HeLa	$3 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^{10}$	1.5
	293	$3 \cdot 10^{10}$	$3 \cdot 10^{10}$	1

Tabelle 3: Plaquetest von H2 ts214 und wt Ad 2 auf HeLa- und 293-Zellen

4.1.2 Wachstum von H2 ts214 bei permissiver und nichtpermissiver Temperatur.

Zeigt die Mutante einen Defekt in der DNA-Replikation, so darf unter restriktiven Bedingungen keine DNA-Neusynthese nachzuweisen sein. Wie unter Methoden beschrieben, wurden HeLa-Zellen mit einer Multiplizität von 10 bis 20 PFU/Zelle mit H2 ts214 bzw. Ad2 infiziert und bei 39°C, 40.5°C oder 32°C gehalten. Zu verschiedenen Zeiten nach Infektion wurde mit ^3H -Thymidin für 1 Stunde bei 39°C oder 40.5°C bzw. 2 Stunden bei 32°C pulsmarkiert. Die unterschiedlichen Pulszeiten wurden deshalb gewählt, weil damit bei vergleichenden Versuchen mit wildtyp-infizierten Zellen die gleichen Radioaktivitätseinbauraten bei 32° und 39° gefunden wurden (Abb. 6) (Bodnar und Pearson, 1980). Nach dem Ende der Pulszeit wurden etwa 10^4 Zellen auf einem alkalischen Sucrosegradienten lysiert und nach Zentrifugation in Gegenwart von ^{32}P Marker-DNA analysiert.

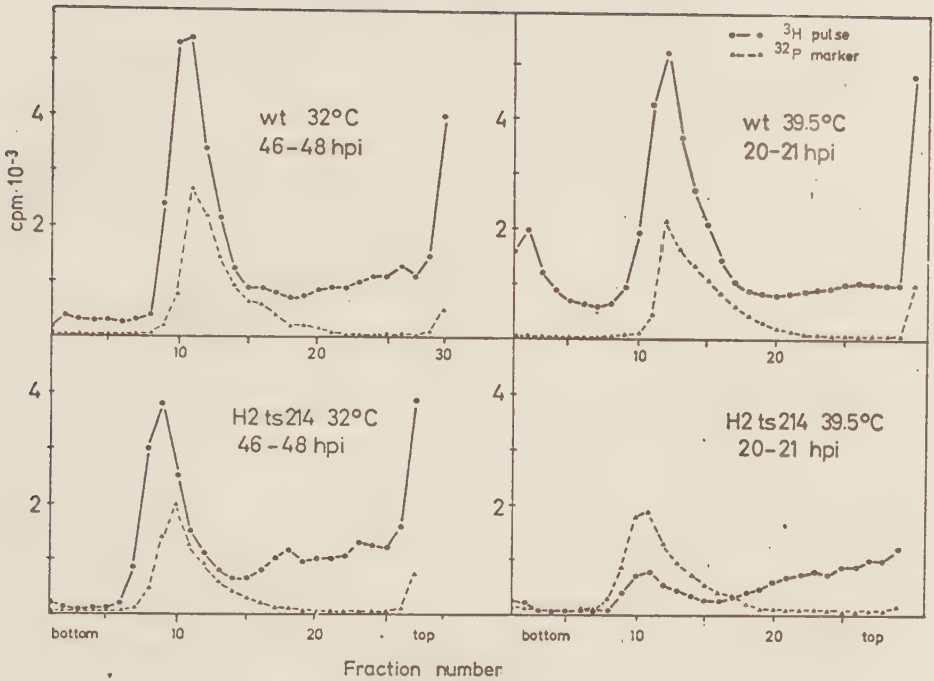


Abbildung 6: Analyse von pulsmarkierter viraler DNA auf alkalischen Sucrosegradienten. H2 ts214 bzw. Ad 2-infizierte HeLa-Zellen wurden 20 hpi (39.5°C) 1 Stunde bzw. 46 hpi (32°C) 2 Stunden mit ^3H -Thymidin pulsmarkiert (3.11.2). Anschließend wurden die Zellen gewaschen und eine Probe von 10.000 Zellen auf alkalischen Sucrosegradienten lysiert und zentrifugiert (3.12.1.). (Sedimentation von rechts nach links) $\bullet\text{---}\bullet = ^3\text{H}$ -pulsmarkierte DNA, $\triangle\text{---}\triangle = ^{32}\text{P}$ -Ad 2-DNA-Marker

Wie Abb. 7 zeigt, liegt das Maximum der DNA-Synthese unter permissiven Bedingungen bei 35 - 50 Stunden nach Infektion. Bei einer nicht-permissiven Temperatur von 39°C ist die DNA-Synthese um 75 %, bei 40.5°C um 90 % reduziert. Häufig zeigt jedoch auch der Wildtyp bei einer Inkubationstemperatur von 40.5°C eine stark reduzierte Aktivität. Auch uninfi-

zierte HeLa-Zellen sterben nach 20 Passagen in Gewebekultur leicht ab, wenn man sie bei 40.5°C inkubiert. Deshalb wurde eine restriktive Temperatur von 39.4 - 39.8°C gewählt. Unter diesen Bedingungen zeigt H2 ts214 eine Reduktion der DNA-Synthese auf 15 - 20 % der Normalwerte. Dieser Versuch bestätigt, daß die Mutante H2 ts214 einen Defekt in der DNA-Replikation hat.

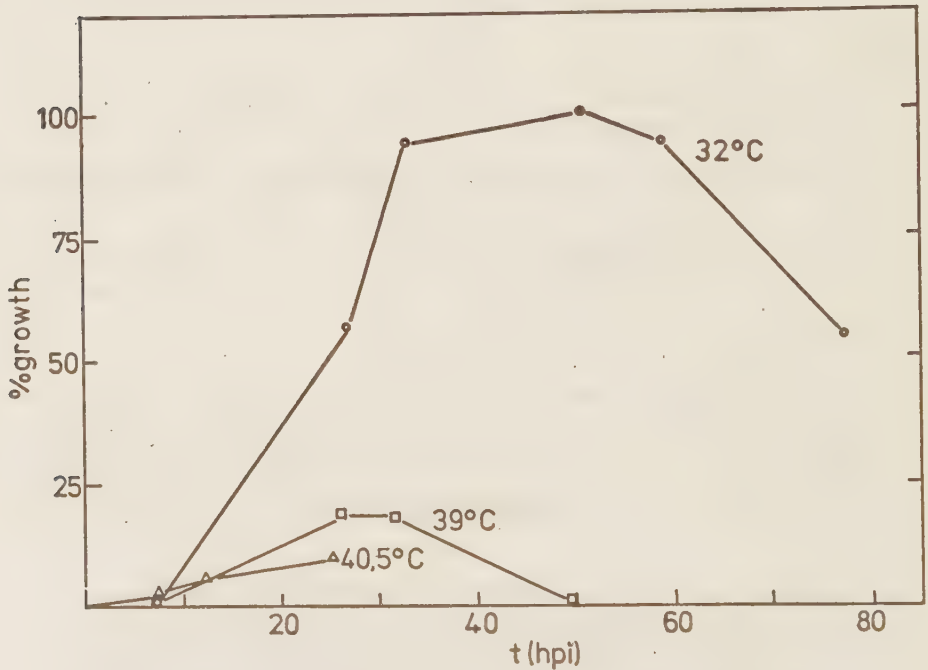


Abbildung 7: Wachstumskinetiken der Mutante H2 ts214 bei permissiver (32°C) und nicht-permissiver (39°C, 40.5°C) Temperatur. HeLa-Zellen wurden mit H2 ts214 in einer Multiplizität von 10 PFU/Zelle infiziert und bei 32°, 39° oder 40.5°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde mit ^3H -Thymidin (32° : 2h, 39 und 40.5° : 1h) pulsmarkiert (3.11.2) und etwa 10.000 Zellen auf alkalischen Sucrosegradienten lysiert und zentrifugiert (3.12.1.) 100 % = 5017 cpm (○—○ = 32°, □—□ = 39°, ▲—▲ = 40.5°).

4.1.3 Virale DNA-Synthese nach Temperaturerhöhung auf restriktive Bedingungen.

Nachdem gezeigt worden war, daß die DNA-Replikation unter nicht permissiven Bedingungen stark reduziert ist, war es notwendig herauszufinden, ob es möglich ist, die DNA-Synthese zu einem Zeitpunkt, bei dem sie unter permissiven Bedingungen mit optimaler Geschwindigkeit abläuft, durch Temperaturerhöhung auf restriktive Bedingungen ("shift-up") zum Stillstand zu bringen. Zu diesem Zwecke wurden H2 ts214-infizierte bzw. Ad 2-infizierte HeLa-Zellen 47 Stunden bei 32°C - nach Erreichen des Maximums der viralen DNA-Synthese - bei 39.5°C weiter inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde die DNA-Synthese durch einen 30 minütigen ³H-Thymidinpuls und anschließender Sedimentation im alkalischen Sucrosegradienten gemessen. Wie Abb. 8 zeigt, wird die virale DNA-Synthese bei wildtyp-infizierten Zellen nach der Temperaturerhöhung beschleunigt. Dagegen zeigen H2 ts214-infizierte Zellen nur während der ersten 30 Minuten nach der Temperaturerhöhung eine leicht beschleunigte Syntheserate, die dann rapide abnimmt und nach 3 Stunden - sieht man von der immer vorhandenen Restaktivität in der viralen DNA-Synthese von etwa 20 % ab - total zum Stillstand kommt.

Diese Beobachtung legt nahe, daß eine zum Zeitpunkt der Temperaturerhöhung begonnene Replikationsrunde beendet wird, aber nicht mehr neuinitiiert wird.

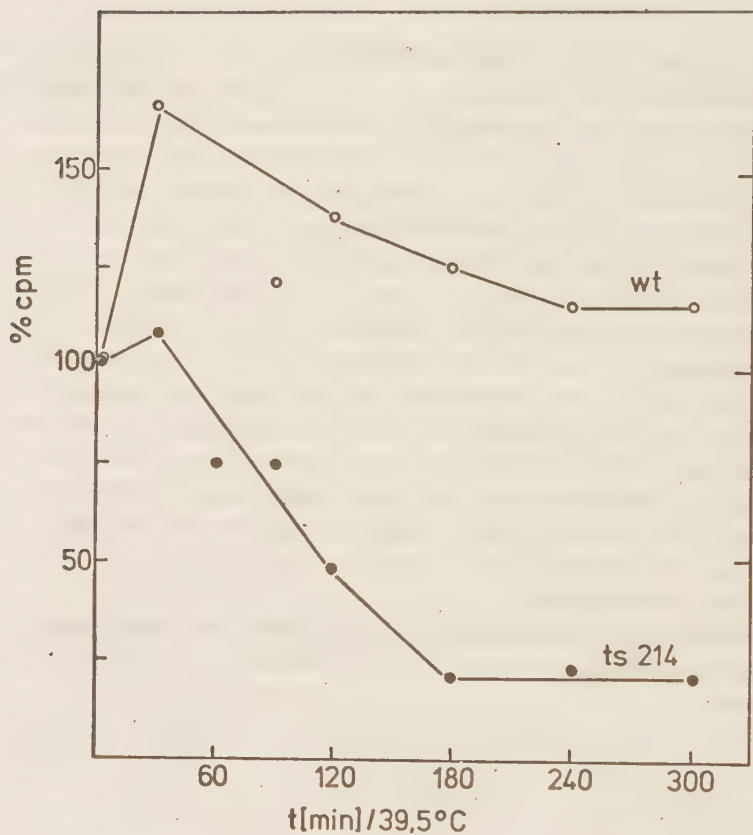


Abbildung 8: Abschalten der viralen DNA-Synthese nach Temperaturerhöhung auf 39,5°C.

HeLa-Zellen wurden mit H2 ts214 oder Ad 2 (10 PFU/Zelle) infiziert, 47 h bei 32°C inkubiert und anschließend auf 39,5°C gebracht (3.11.1). Zu den angegebenen Zeiten wurde mit ³H-Thymidin 30 Minuten pulsmarkiert (3.11.2). 10.000 Zellen wurden auf alkalischen Sucrosegradienten lysiert und zentrifugiert (3.12.1) H2 ts214 ●—● 100 % : 2270 cpm, Ad2 ●—○ 100 % : 3030 cpm.

4.1.4 H2 ts214 ist eine Initiationsmutante

Nachdem "up-shift"-Experimente gezeigt hatten, daß die DNA-Replikation nach Temperaturerhöhung nicht unmittelbar zum Erliegen kommt, sondern noch zwei bis drei Stunden weiterläuft, konnte man annehmen, daß es sich bei H2 ts214 nicht um eine Mutante mit einem Defekt in der Elongation der DNA-Synthese handelt. Durch "Puls-chase"-Experimente wurde gezeigt, daß die DNA-Replikation, die bei 32°C begonnen worden waren, nach Temperaturerhöhung auf 39.5°C vollendet werden kann. Zum Nachweis wurden Ad 2- bzw. H2 ts214-infizierte HeLa-Zellen 45 Stunden bei 32°C inkubiert, 15 Minuten mit ^3H -Thymidin pulmarkiert und sofort anschließend mit einem Überschuß an "kaltem" Thymidin bei 39.5°C weiterinkubiert, und die Zellen nach verschiedenen Inkubationsperioden durch alkalische Sucrosezentrifugation analysiert (Abb. 9).

Bei den DNA-Proben, die unmittelbar nach dem Puls isoliert worden waren, findet man neben fertiger DNA eine breite Verteilung an replizierenden Molekülen, die im alkalischen Sucrosegradienten langsamer als die zugesetzte Marker-DNA sedimentieren. Während des "chase" verschwindet die replizierende DNA und die Menge an fertiger DNA nimmt merklich zu. Der Übergang in der Markierung von langsam sedimentierender zu 34 S DNA geschieht mit der gleichen Geschwindigkeit bei Ad 2- und H2 ts214-infizierten Zellen. Dieses Ergebnis zeigt, daß DNA-Moleküle, deren DNA-Replikation bei permissiver Temperatur initiiert worden war, diese Moleküle unter restriktiven Bedingungen fertig replizieren.

Es konnte also ausgeschlossen werden, daß der Defekt der Mutante in der DNA-Elongation liegt. Ob der Defekt nun in der Initiation oder in der Termination liegt, kann nicht unterschieden werden.

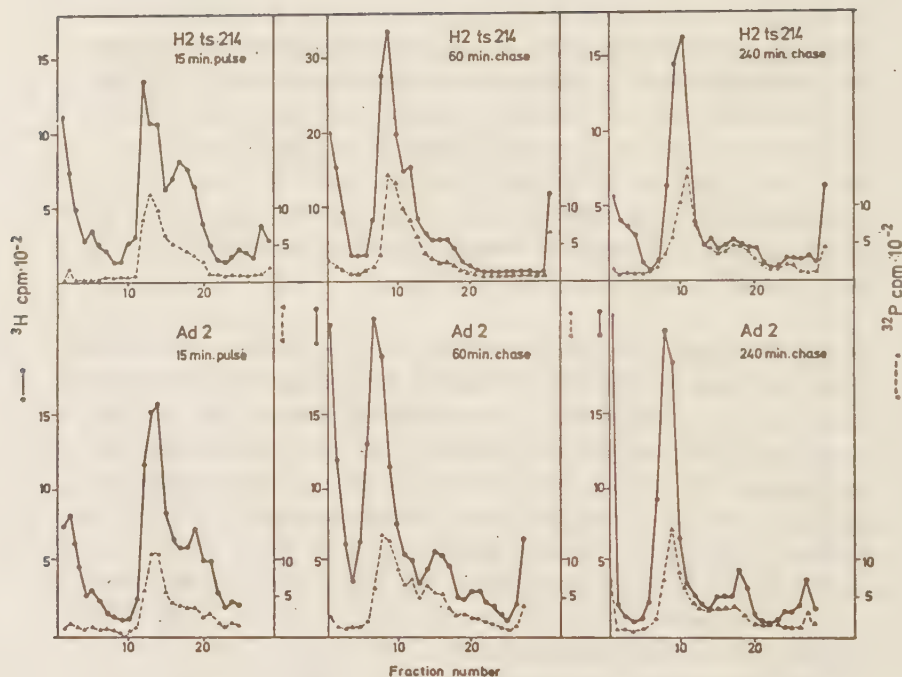


Abbildung 9: Analyse von viraler DNA nach Pulsmarkierung bei 32°C und "chase" bei 39.5°C durch Sedimentation im alkalischen Sucrosegradienten.

H2 ts214- oder wt-infizierte HeLa-Zellen wurden 45 Stunden bei 32°C inkubiert, 15 Minuten mit ^3H -Thymidin pulsmarkiert und anschließend in Gegenwart von 0.15 M "kaltem" Thymidin bei 39.5°C weiterinkubiert (3.11.3). 10.000 Zellen wurden entweder unmittelbar nach dem Puls oder nach verschiedenen Zeiten während des "chase" auf alkalischen Sucrosegradienten lysiert und nach Zugabe von ^{32}P -Ad 2-Marker-DNA zentrifugiert (2.12.1). (Sedimentation von rechts nach links)

●—● = ^3H -pulsmarkierte Probe, ▲---▲ = ^{32}P -markierte Ad 2-Marker DNA.

4.1.5 Initiation der DNA-Replikation nach Temperaturerniedrigung auf 32°C

Ziel der Arbeit mit temperatursensitiven Mutanten war es, durch die entsprechenden "shift"-Experimente eine Synchronisation der DNA-Replikation zu erreichen, um mit dieser Methode Aussagen über die Initiation der DNA-Synthese machen zu können. Selbstverständlich mußte geprüft werden, ob der Defekt der Mutante reversibel war, ob es also möglich war, die unter nicht-permissiven Bedingungen akkumulierten DNA-Moleküle synchron neu zu initiieren.

Hierzu wurden H2 ts214-infizierte HeLa-Zellen 18 Stunden bei 39.8°C inkubiert, anschließend auf permissive Temperatur gebracht und gleichzeitig mit ^3H -Thymidin pulsmarkiert. Nach 15, 30, 60 und 120 Minuten wurden die Zellen lysiert und das Produkt durch alkalische Sucrosegradientenzentrifugation analysiert (Abb. 10). In diesem Experiment wurde neusynthetisierte DNA radioaktiv markiert. Nach 15 Minuten findet man eine heterogene Verteilung an radioaktivem Material, das langsamer als die 34 S-Marker DNA sedimentiert. Die Größe der viralen DNA nimmt mit steigender Pulszeit zu. Nach 60 Minuten sedimentiert das Reaktionsprodukt vorwiegend mit 34 S. Das Ergebnis dieses Temperaturerniedrigungsexperimentes zeigt, daß der Defekt in der Mutante durch Temperaturerniedrigung auf permissive Bedingungen aufgehoben werden kann.

4.1.6 Charakterisierung der neusynthetisierten DNA nach Temperaturerniedrigung auf permissive Bedingungen

Da bei 39.5°C keine DNA synthetisiert wird, und nach einer Temperaturerniedrigung auf 32°C mit steigender Pulszeit länger werdende DNA-Moleküle isoliert werden können, kann man postulieren, daß nach dem "shift-down" die DNA-Synthese am Initiationsort mit der ersten Replikationsrunde beginnt. Das bedeutet, daß kurz nach der Temperaturerniedrigung der Hauptanteil der DNA-Moleküle als replikative Formen mit Einzelstranganteilen, die die verdrängten Elternstränge darstellen, vorliegen müssen.

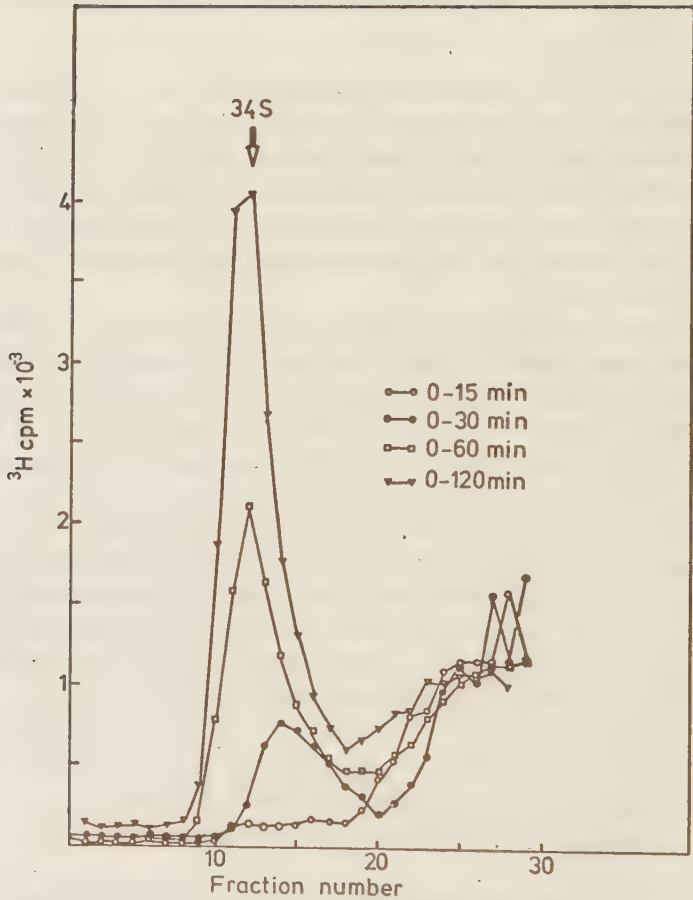


Abbildung 10: Initiation der viralen DNA-Replikation nach "downshift" auf 32°C . H2 ts214-infizierte HeLa-Zellen wurden nach 18 stündiger Inkubation bei 39.8°C auf 32°C gebracht und gleichzeitig für die angegebenen Zeiten mit ^3H -Thymidin pulsmarkiert (3.12.1). Der Pfeil zeigt die Position von ^{32}P -Ad2-Marker-DNA (34'S) an. (Sedimentation von rechts nach links).

Mit steigender Inkubationszeit bei 32°C sollte sich dann der Anteil an fertig replizierten doppelsträngigen DNA-Molekülen erhöhen. Durch BND-Cellulose-chromatographie kann man zwischen den beiden Formen der DNA unterscheiden. Doppelsträngige DNA eluiert von der BND-Cellulosesäule mit 1 M NaCl, während DNA, die Einzelstranganteile aufweist, zur Elution zusätzlich 2 % Coffein benötigt (Winnacker et al., 1972, van der Eb, 1973, Horwitz, 1976). Diese Methode wurde angewendet, den Anteil an replizierender DNA nach verschiedenen Pulszeiten bei 32°C zu ermitteln. 10, 20, 40, 60 und 240 Minuten nach dem "shift-down" wurde virale DNA von zellulärer DNA nach der modifizierten Methode von Hirt (1967) abgetrennt und durch BND-Cellulose-chromatographie (3.10) in doppelsträngige (ss) DNA und DNA mit Einzelstranganteilen (ds) DNA aufgetrennt. Abb. 11 zeigt, daß kurz nach der Temperaturniedrigung Radioaktivität bevorzugt in replizierende DNA eingebaut wird. Das Verhältnis ss DNA zu ds DNA nimmt mit steigender Pulszeit erheblich ab und bleibt nach etwa 60 Minuten konstant.

Pulszeit (min/32°C)	Inkubationsbedingungen vor dem "down-shift"	
	a) 16 h 39.5°C % ss DNA	b) 42 h 32°C → 4 h 39.5°C % ss DNA
10	70	82
20	72	64
40	38	n.b.
60	17	18
240	8	n.b.

Tabelle 4: Anteil von replizierender DNA (ss DNA) in pulsmarkierter viraler DNA.

2 ts214-infizierte HeLa-Zellen wurden 16 Stunden bei 39.5°C (a) oder 42 Stunden bei 32°C und anschließend 4 Stunden bei 39.5°C (b) inkubiert und unmittelbar nach dem anschließenden "shift-down" auf 32°C für die angegebenen Zeiten mit 3H-Thymidin pulsmarkiert. Virale DNA wurde nach der modifizierten Methode von Hirt (1967) isoliert (3.12.2) und mittels BND-Cellulose-Chromatographie in ss DNA und ds DNA aufgetrennt (3.10). Der Anteil von ss DNA in der gesamten markierten DNA ist in % angegeben. n.b. = nicht bestimmt

Man findet im Versuchsergebnis keinen signifikanten Unterschied, wenn man die H2 ts214-infizierten Zellen vor der Temperaturerniedrigung und dem ^3H -Thymidinpuls nur bei restriktiver Temperatur inkubiert oder ob man die DNA-Synthese nach 42-stündiger Inkubation bei 32°C vor dem ^3H -Thymidinpuls durch vierstündige Inkubation bei 39.5°C unterbricht (Tab.4).

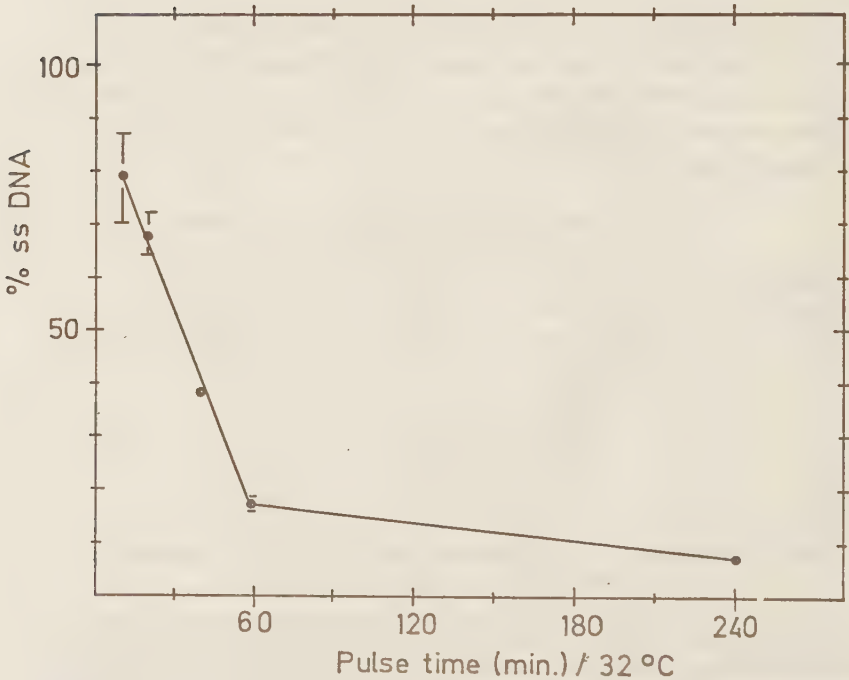


Abbildung 11: Anteil von replizierender DNA (ss DNA) in pulsmarkierter viraler DNA. H2 ts214-infizierte HeLa-Zellen wurden 16 Stunden bei 39.5°C inkubiert, durch "downshift" (3.11.1) auf 32°C gebracht und gleichzeitig mit ^3H -Thymidin pulsmarkiert. (3.11.2). Isolation und Bestimmung von DNA mit Einzelstranganteil erfolgte wie in Tabelle 4 beschrieben.

4.1.7 Lokalisierung der Replikationsursprungsorte auf dem viralen Genom

Es konnte gezeigt werden, daß die Mutante H2 ts214 wahrscheinlich einen Defekt in der Initiation der DNA-Replikation aufweist und daß aufgrund der Reversibilität dieses Fehlers durch die entsprechende Temperaturveränderung eine Synchronisation der DNA-Replikation möglich ist. Kurz nach dem Beginn der DNA-Replikation nach der Temperaturerniedrigung sollten bei einem radioaktiven Puls bevorzugt die Anteile der DNA markiert sein, die den Initiationsort der DNA-Replikation tragen. Bei Pulsperioden, die viel länger als die Dauer einer Replikationsrunde sind, sollte die Radioaktivität in neusynthetisierter DNA gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt sein.

Von diesen Überlegungen ausgehend wurden H2 ts214-markierte HeLa-Zellen nach der Temperaturerniedrigung auf 32°C verschieden lange pulsmarkiert, die virale DNA isoliert und mittels BND-Cellulose-chromatographie in replizierende und doppelsträngige DNA aufgetrennt. Die replikativen Formen wurden in Gegenwart von ^{32}P -Ad 2-Marker DNA mit der Restriktionsendonuklease Hpa I geschnitten und die Fragmente auf einem Mischgel aus 1.5 % Polyacrylamid und 0.8 % Agarose aufgetrennt.

Das Ergebnis einer typischen Hpa I-Verdauung einer Mischung aus ^3H -DNA, die nach dem "shift-down" 40 Minuten pulsmarkiert worden war und einheitlich markierter ^{32}P Marker DNA ist in Abb. 12 gezeigt. Man erkennt, daß das Restriktionsmuster der Mutante dem des Wildtyps entspricht, wobei die beiden Randfragmente E und G stärker markiert sind als die internen Fragmente. Die beiden größten Fragmente A (29.1 % des Genoms) und B (28 % des Genoms) werden unter den verwendeten Gelbedingungen nicht aufgetrennt.

Die relative Radioaktivität der einzelnen Fragmente wird bestimmt, indem das Verhältnis von pulsmarkierter ^3H -Radioaktivität zu der ^{32}P -Markerradioaktivität gebildet wird.

Eine Zusammenfassung von Ergebnissen, die aus 20-, 40-, 60- und 240-minütiger, pulsmarkierter DNA erhalten wurden, sind in Abb.13 gezeigt.

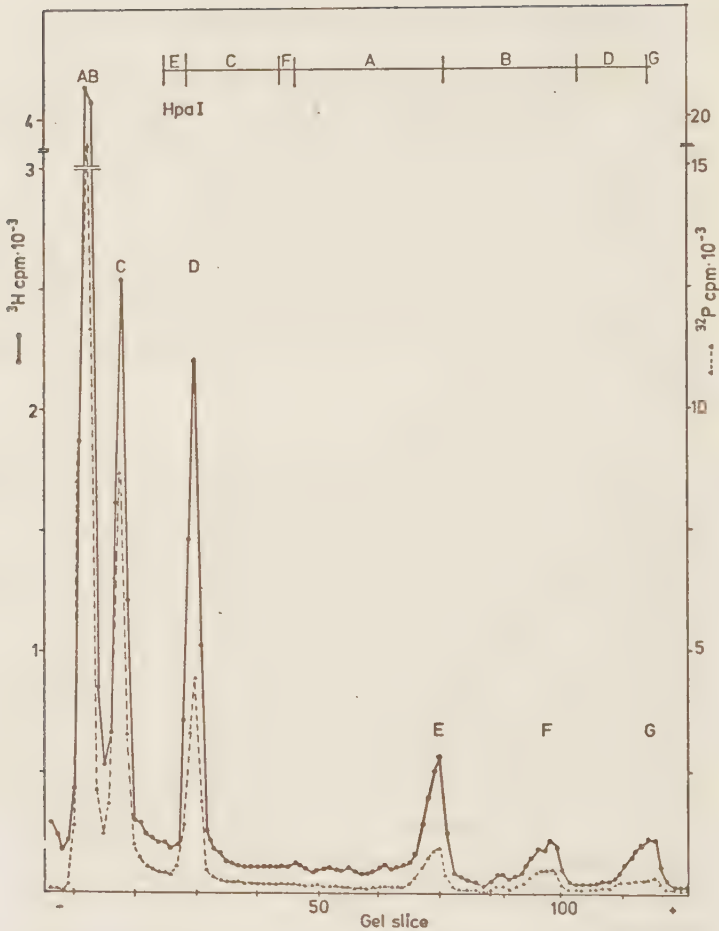


Abbildung 12

Gelelektrophorese von pulsmarkierter DNA nach der Fragmentierung mit dem Restriktionsenzym Hpa I.

H2 ts214-infizierte HeLa-Zellen wurden 16 Stunden bei 39°C inkubiert und anschließend durch "downshift" auf 32°C gebracht (3.11.1) und gleichzeitig mit ^3H -Thymidin für 40 Minuten pulsmarkiert (3.11.2). Virale DNA wurde nach einer modifizierten "Hirt"-Methode isoliert (3.12.2) und mittels BND-Cellulose-Chromatographie in doppelsträngige (ds) DNA und DNA mit Einzelstranganteilen (ss) aufgetrennt (3.10) ss-DNA wurde in Gegenwart von ^{32}P -Ad2-Marker-DNA mit Hpa I fragmentiert (3.6) und die Fragmente auf einem Mischgel aus 1.5 % Polyacrylamid und 0.8 % Agarose aufgetrennt (3.8.1). Nach der Elektrophorese wurden die Gele geschnitten und die Radioaktivität in den einzelnen Fragmentscheiben bestimmt. ●—● ^3H cpm pulsmarkierte DNA, ▲---▲ ^{32}P cpm Ad 2 Marker DNA

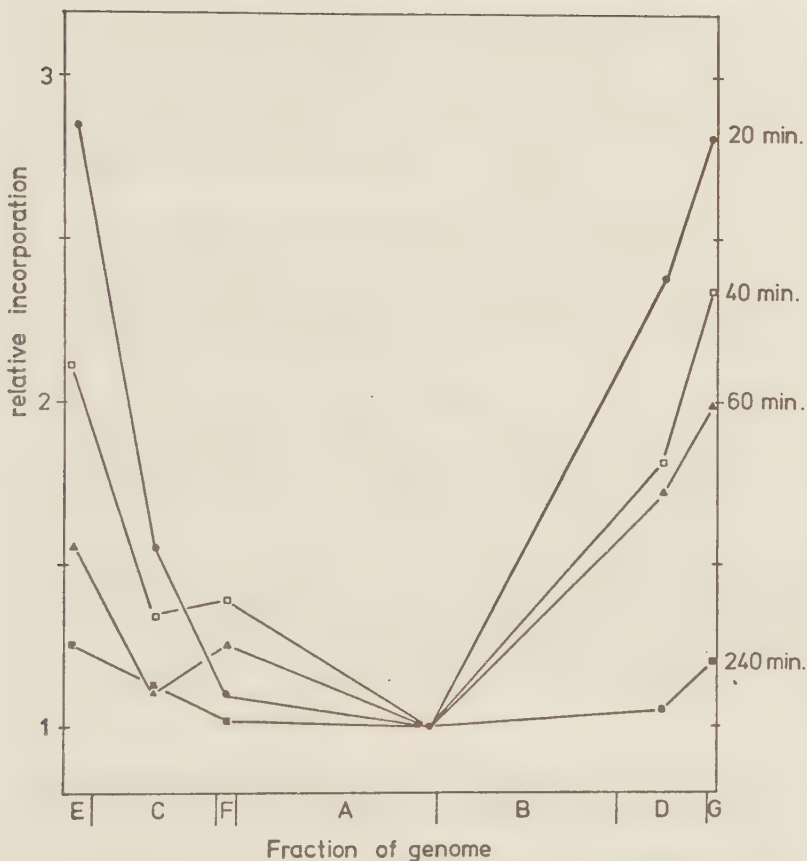


Abbildung 13:

Relativer Radioaktivitätseinbau in Restriktionsfragmente pulsmarkierter viraler DNA.

H2 ts214-infizierte HeLa-Zellen wurden 16 Stunden bei 39.5°C inkubiert und anschließend durch einen "downshift" auf 32°C gebracht und gleichzeitig mit ^3H -Thymidin pulsmarkiert (3.11.2). Nach 20 (●—●), 40 (□—□), 60 (▲—▲) und 240 (■—■) Minuten wurde ss-DNA wie unter Abb. 12 beschrieben isoliert und in Gegenwart von ^{32}P -Ad-2-Marker-DNA mit Hpa I fragmentiert (3.6). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (3.8.1) wurde für jedes der Fragmente die Menge an ^3H - und ^{32}P -Radioaktivität bestimmt, auf den unterschiedlichen Thymidingehalt hin korrigiert und als Funktion der Lage der Fragmente auf dem Ad 2-Genom als relativer Radioaktivitätseinbau dargestellt. Die Werte des relativen Einbaus sind auf die nicht aufgetrennten Fragmente A und B ($AB = 1$) bezogen.

In jedem Falle findet man Gradienten des relativen Radioaktivitätseinbaus, die, vom Zentrum des viralen Genoms ausgehend, ihre Maxima gegen die beiden molekularen Enden des Genoms hin erreichen, wobei die Steigung zu beiden Enden hin etwa das gleiche Ausmaß erreicht, wodurch sich ein U-förmiges Verteilungsmuster des relativen Radioaktivitätseinbaus entlang dem linearen Ad-Genom ergibt.

Den größten Unterschied zwischen dem relativen Radioaktivitätseinbau an den Enden und dem Zentrum des Moleküls findet man nach kurzen Pulszeiten. Nach einer Pulszeit von 20 Minuten sind die beiden Ranfragmente Hpa I-E und Hpa I-G etwa drei mal stärker markiert als die internen Fragmente AB.

Mit steigenden Pulszeiten nach dem "shift-down" nimmt die Steigung der Gradienten zu den molekularen Enden hin ab, bis sie nach einer Pulsdauer von 240 Minuten fast vollständig verschwunden sind. Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß sich die Ursprungsorte der DNA-Replikation an den beiden Enden des linearen Ad-Genoms befinden müssen, daß diese Regionen bei Beginn der viralen DNA-Replikation nach einer Temperaturerniedrigung durch Maxima des relativen Radioaktivitätseinbaus charakterisiert sind und dies umso mehr, je kürzer die Pulszeiten nach dem "shift-down" gewählt sind.

4.1.8 Analyse der Strangzugehörigkeit von neueingebauter Radioaktivität an den beiden Replikationsursprungsorten.

Trifft bei der DNA-Replikation von Adenoviren das Modell der "Displacementsynthese" zu, so sollte bei der Markierung replizierender, neu-initiiertter DNA Moleküle der Einbau von Radioaktivität an den Initiationsorten strangspezifisch erfolgen. Wählt man eine Pulszeit, die kürzer ist als eine Replikationsrunde, so sollten an beiden Genomenden nur der Strang markiert sein, der das 5'-Ende des viralen Genoms trägt.

Weingärtner et al. (1976) verbesserten eine von Sharp et al. (1974) entwickelte Methode zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Restriktionsfragmenten in ihre komplementären Einzelstränge. Durch Reassoziationsexperimente wurde nachgewiesen, daß die Verteilung der Radioaktivi-

tät in 2 "peaks" nach der Gelelektrophorese die komplementären Einzelstränge des jeweiligen Restriktionsfragmentes darstellen (Weingärtner et al., 1976). Durch Filterhybridisierungsexperimente konnten die voneinander getrennten Fragmentstränge den getrennten Strängen der intakten, viralen DNA zugeordnet werden (Weingärtner et al., 1976) (Abb. 5).

Der relative Thymidingehalt der getrennten Fragmentstränge wurde bestimmt, indem homogen markierte ^{32}P - mit ^3H -Thymidin markierter Ad 2-Marker-DNA gemischt und mit Restriktionsenzymen fragmentiert wurden. Die verschiedenen Restriktionsfragmente wurden gelelektrophoretisch in die Einzelstränge aufgetrennt und für jedes Fragment der Anteil beider Markierungen in den beiden Komplementärsträngen ermittelt. Während die beiden Fragmentstränge erwartungsgemäß mit ^{32}P -Orthophosphat gleichmäßig markiert waren, zeigten die jeweils schneller wandernden Stränge eines Fragmentes eine höhere ^3H -Thymidin Markierung (Weingärtner et al., 1976).

Diese Methode, die es ermöglicht, Fragmentstränge in ihre komplementären Einzelstränge aufzutrennen und diese den getrennten Strängen von intakter, viraler DNA zuzuordnen, wurde angewandt, um die Strangzugehörigkeit von neu eingebauter Radioaktivität an den beiden Replikationsursprungsstellen zu analysieren.

Aus "down-shift"-Experimenten, bei denen die Pulszeit 30 Minuten betrug, wurde die replizierende DNA isoliert und nach Zugabe von ^{32}P -Marker-DNA mit dem Restriktionsenzym Hpa I fragmentiert. Nach der elektrophoretischen Trennung der Fragmente auf Agarose-Polyacrylamidmischgelen (3.8.1) wurden die beiden Randfragmente E und G aus dem Gel eluiert und durch CsCl-Stufengradientenzentrifugation gereinigt. Nach alkalischer Denaturierung wurden die beiden komplementären Stränge eines Fragments gelelektrophoretisch voneinander getrennt (3.8.2) und die Verteilung der Pulsmarkierung in den komplementären Fragmentsträngen gemessen (Weingärtner et al., 1976).

Abb. 14 zeigt die Strangtrennung des Restriktionsfragmentes Hpa I-E, das am linken Ende des Ad 2-Genoms kartiert.

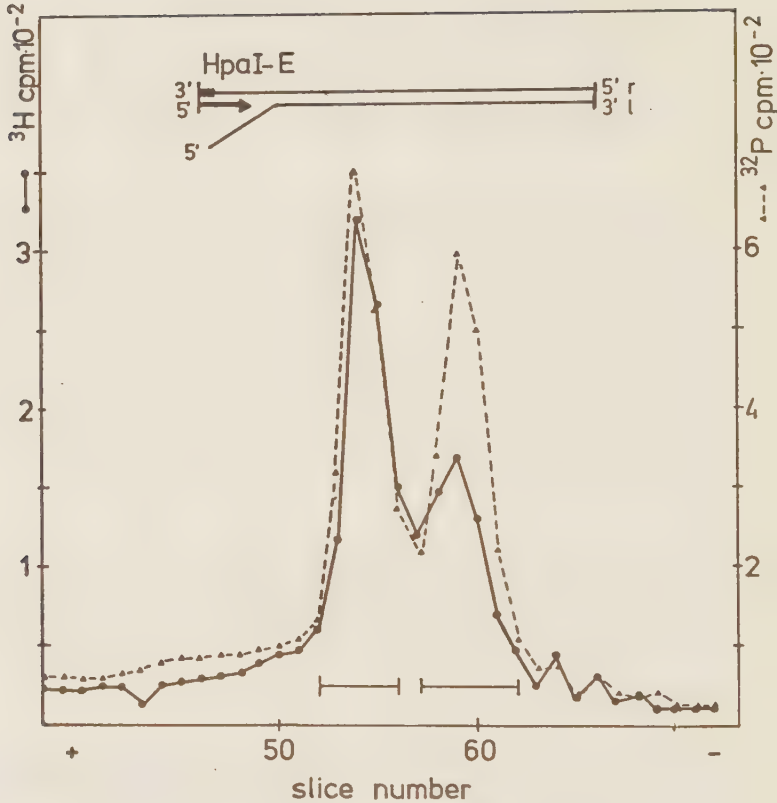


Abbildung 14: Elektrophoretische Strangtrennung des Restriktionsfragmentes Hpa I-E vom molekularen linken Ende der Ad 2-DNA. H2 ts214-infizierte HeLa-Zellen wurden 45 Stunden bei 32°C und 4 Stunden bei 39.5°C inkubiert. Bei dem anschließenden "downshift" auf 32°C wurde gleichzeitig mit ^3H -Thymidin 30 Minuten pulsmarkiert (3.11.2). Nach der Isolierung von DNA mit Einzelstranganteil (3.10) wurde diese mit dem Restriktionsenzym Hpa I fragmentiert. Das aus dem Gel isolierte Restriktionsfragment Hpa I-E wurde denaturiert und elektrophoretisch in die beiden komplementären Stränge aufgetrennt (3.8.2). Die Striche unter den getrennten Fragmentsträngen bezeichnen jede Gelfraktion, die bei der Bestimmung des Radioaktivitätsverhältnisses (Tabelle 5) verwendet wurden. Die Anode befand sich links.

●—● ^3H cpm des Pulses nach dem "downshift" auf 32°C
 ▲---▲ ^{32}P cpm homogen markierter Ad 2 DNA.

Während die getrennten Fragmentstränge der ^{32}P -Marker-DNA gleichmäßig markiert waren, befand sich der größere Anteil der Pulsmarkierung (70 %) in dem schnellen Fragmentstrang. Bei der Bestimmung der Radioaktivität in den getrennten Fragmentsträngen wurden die Gelfractionen berücksichtigt, die durch Striche unter den beiden Strängen gekennzeichnet sind.

Eine Strangtrennung des Fragments Hpa I-G, das am rechten Ende des Ad 2-Genoms kartiert, kann nicht gezeigt werden, da durch das Eluieren des Fragments aus dem Agarosegel und der anschließenden Reinigung im CsCl-Gradienten der Verlust an Radioaktivität so groß war, daß keine Aussagen über die Radioaktivitätsverteilung mehr gemacht werden konnten.

Isotop	a) cpm schneller Strang	a) cpm langsamer Strang	b) Verhältnis	% Radioakti- v. schnellen Strang	c) *	d) korr. Verh.
^{32}P (Marker)	1129	1078	1.04	57.1	58.4	
^3H (Puls)	501	186	2.7	73.0		2.3

Tabelle 5: Radioaktivitätsverteilung in den gelelektrophoretisch getrennten Strängen des Restriktionsfragments Hpa I-E

- a) Die Striche unter getrennten Fragmentsträngen (Abb. 13) kennzeichnen die Gelfractionen, die bei der Bestimmung der Gesamtradioaktivität in den Fragmentsträngen Berücksichtigung fanden.
- b) Radioaktivitätsverhältnis des schnellen zum komplementären langsamen Fragmentstrang.
- c) übernommen von Weingärtner et al., 1976
- d) wie b), nachdem Korrekturen für den unterschiedlichen relativen Thymidingehalt vorgenommen waren.
- * Relativer Thymidingehalt des schnellen Fragmentstranges in %.

4.2 Adenovirus DNA-Synthese IN VITRO

Die folgenden Abschnitte beschreiben Untersuchungen mit Extrakten aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen, die zur Entwicklung eines IN VITRO-Systems führten, das zur Neusynthese von viraler DNA fähig ist.

Zellkerne, die aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen isoliert und zu Portionen à 0.75 ml eingefroren waren, wurden langsam auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von verschiedenen Mengen an 5 M NaCl bzw. 3 M Na-acetat 1 Stunde bei 0°C inkubiert und anschließend bei 12.000 g abzentrifugiert (3.15.1). Die Proteinkonzentration der Überstände, die nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt wurde, betrug bei Ad 2-infizierten und uninfizierten Extrakten zwischen 5 und 10 mg/ml.

4.2.1 Abhängigkeit der Aktivität von der Salzkonzentration

Testet man diese Exakte unter IN VITRO-Standardbedingungen (3.15.2), so findet man mit steigender Salzkonzentration bei der Extraktion einen rapiden Abfall in der dTMP-Inorporationsrate (Abb. 15).

Der Unterschied in der dTMP-Einbaurate ist unerheblich, wenn man statt NaCl Na-acetat für die Extraktion verwendet. Deshalb wurden alle weiteren Extraktionen mit NaCl durchgeführt. Nach der Salzextraktion werden dem Reaktionsgemisch jeweils gleiche Mengen an Extrakten zugegeben. Das heißt, daß mit Erhöhung der Salzkonzentration für die Extraktion auch steigende Mengen an Salz dem IN VITRO-Testansatz zugegeben werden. Um auszuschließen, daß die Ursache für die Reduktion der DNA-Synthese darauf zurückzuführen ist, daß steigende Mengen an Salz die Testbedingungen erheblich verschlechtern, wurden die Extrakte, bevor sie für den Test verwendet wurden, vier Stunden gegen isotonischen Puffer dialysiert. Die darauffolgende Analyse zeigt keinen Unterschied in der dTMP-Einbaurate in säureunlösliches Material (Abb.16).

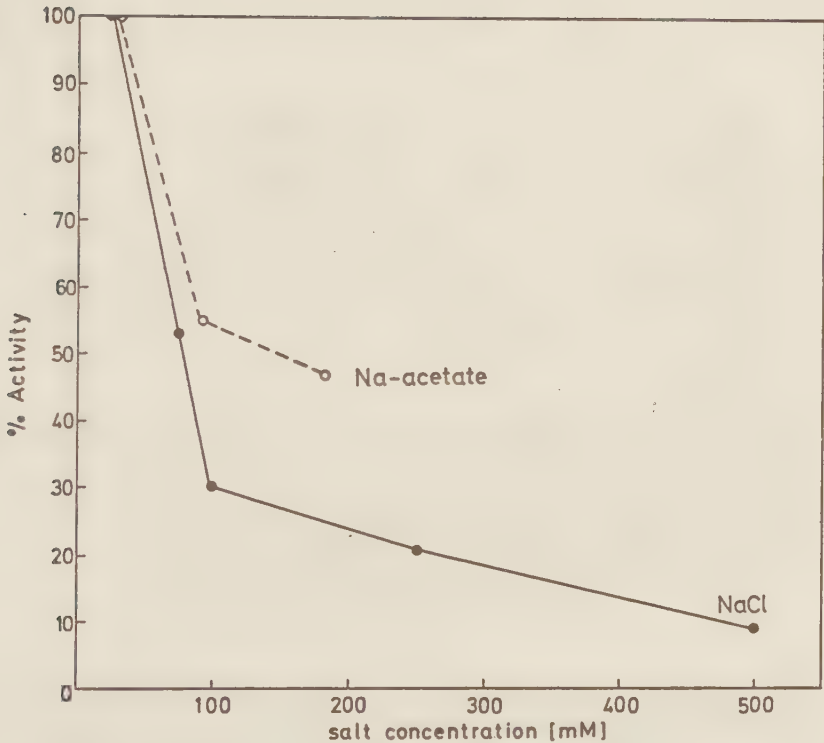


Abbildung 15: Salzabhängigkeit der spezifischen Aktivität von Kernextrakten für die Ad 2 DNA-Synthese. Kernextrakte wurden hergestellt, indem Ad 2-infizierte Zellkerne (3.14.1) 1 Stunde mit den angegebenen Konzentrationen an NaCl oder Na-acetat bei 0°C inkubiert wurden. IN VITRO-DNA-Replikation wurde unter optimalen Bedingungen (3.14.3) für 45 Minuten bei 30°C durchgeführt. Der Einbau von Nukleotiden in DNA wurde als TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.
100 % = Einbau von 21 pMol dTMP (6311 cpm)

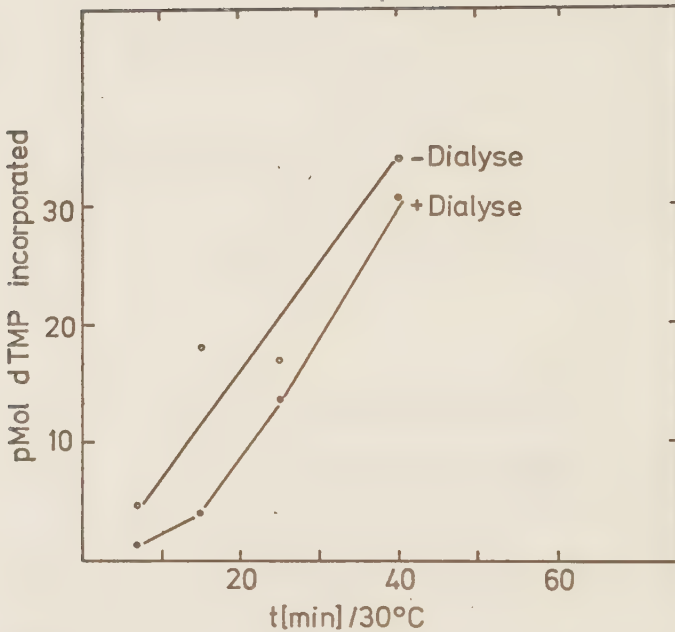


Abbildung 16: Analyse von Kernextrakten aus Ad 2-infizierten Zellen nach der Dialyse gegen isotonischen Puffer. Kernextrakte wurden mit 100 mM NaCl hergestellt und undialysiert (○—○) oder nach vierstündiger Dialyse gegen isotonischen HEPES-Puffer (●—●) unter Standardbedingungen (3.14.3) in einen IN VITRO-Replikationsansatz eingesetzt.

Im alkalischen Sucrosegradienten sedimentiert die neusynthetisierte DNA mit intakter, viraler Marker-DNA, unabhängig davon, ob die Extraktion mit niedriger oder hoher Kochsalzkonzentration durchgeführt worden war. Lediglich die Menge an neusynthetisierter DNA ist nach Extraktion mit hoher Kochsalzkonzentration erniedrigt (Abb. 17).

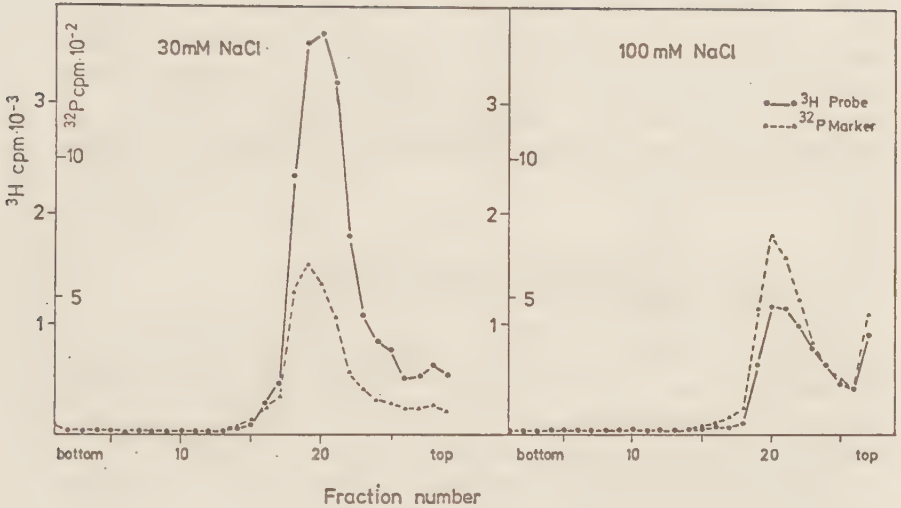


Abbildung 17: Sedimentationsanalyse des IN VITRO-Reaktionsproduktes nach Verwendung von verschiedenen Salzkonzentrationen für die Präparation von Kernextrakten. Kernextrakte wurden mit 30 mM oder 100 mM NaCl hergestellt (3.14.2) und die DNA-Replikation unter Standardbedingungen durchgeführt (3.14.3). Nach 45 minütiger Inkubation wurden 50 μl der Proben auf alkalischen Susrosegredienten lysiert und nach Zugabe von ^{32}P -Ad 2-Marker-DNA zentrifugiert (3.12.1) (Sedimentation von rechts nach links).

Es wurden deshalb alle Versuche mit Extrakten, die mit 30 mM NaCl aus den Zellkernen eluiert worden waren, durchgeführt. Bei einigen Kernpräparaten war allerdings das aus einer Extraktion mit 30 mM NaCl resultierende Reaktionsprodukt bei Sedimentation im alkalischen Sucrosegredienten im Vergleich zu intakter Marker-DNA zu niedrigeren S-Werten hin verschoben. Führt man die Extraktion mit 50 bis 200 mM NaCl durch, konnte dieses Phänomen nie beobachtet werden, so daß man bei weiteren Arbeiten die Salzkonzentration für die Extraktion nicht zu niedrig ansetzen sollte, um diese Schwankungen zu vermeiden.

In keinem Fall wurde bei der alkalischen Sucrosegredientenzentrifugation Formen gefunden, die schneller als Ad 2-Marker-DNA sedimentierten.

Der Aktivitätsverlust bei der DNA-Synthese IN VITRO in Abhängigkeit von der Salzkonzentration bei der Extraktion dürfte wohl darauf zurückzuführen sein, daß mit steigender Salzkonzentration Proteine, die für die DNA-Replikation notwendig sind, denaturieren und damit inaktiviert werden.

4.2.2 Optimaler Zeitpunkt für das Ernten der Zellkerne

Im produktiven Infektionszyklus beginnt die DNA-Synthese, die gleichzeitig den Beginn der "späten" Phase einleitet, etwa 8 bis 12 Stunden nach Infektion und erreicht etwa 18 bis 30 Stunden nach Infektion ein Maximum (Winnacker, 1978, Flint, 1979). Man kann annehmen, daß zu diesem Zeitpunkt Proteine, die für die DNA-Replikation notwendig sind, in optimalen Konzentrationen vorliegen müssen.

Für das Isolieren der Zellkerne sollte nun der Zeitpunkt gefunden werden, zu dem die Extrakte unter IN VITRO-Bedingungen optimal DNA synthetisieren. Zu diesem Zwecke wurden aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen Kerne nach 10 bzw. 20 Stunden geerntet, Extrakte mit 30 mM NaCl eluiert und dem Reaktionsansatz unter Standardbedingungen zugegeben.

Wie Abb. 18 zeigt, findet man keinen signifikanten Unterschied in der dTMP-Einbaurrate, wenn man die Zellkerne 10 oder 20 Stunden nach Infektion erntet. Es wurden daher Zellkerne, die 15 bis 20 Stunden nach Infektion geerntet worden waren, für die IN VITRO-DNA-Replikationsversuche verwendet.

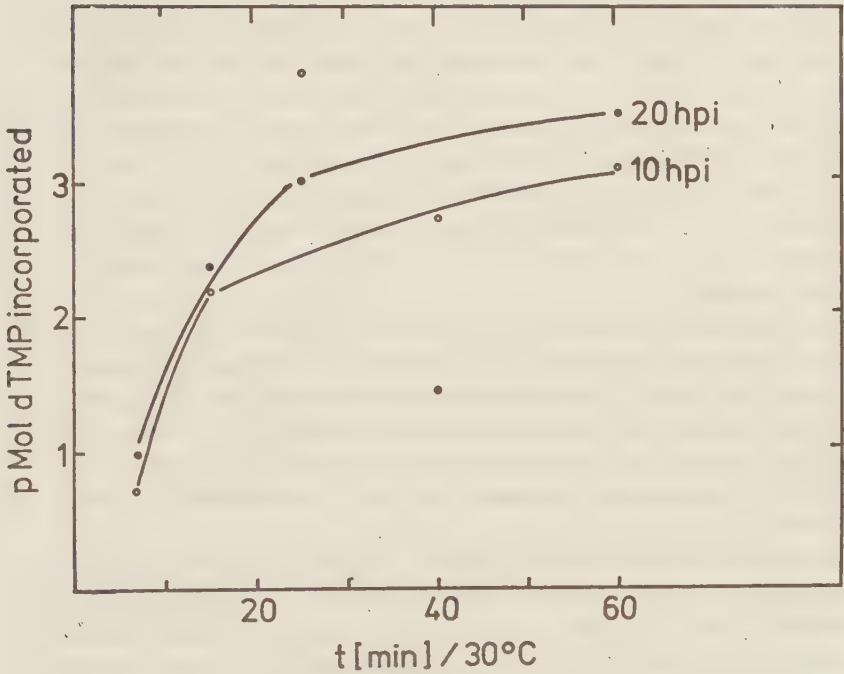


Abbildung 18: Kinetiken der DNA-Replikation IN VITRO unter Verwendung von Extrakten aus Zellkernen, die zu unterschiedlichen Zeiten aus infizierten HeLa-Zellen isoliert wurden. HeLa-Zellen wurden in einer Multiplizität von 100 PFU/Zelle mit Ad 2 infiziert und nach 2 Stunden mit 10 mM Hydroxyharnstoff versetzt. Nach 10 stündiger (○—○) oder 20 stündiger Inkubation (●—●) wurden Zellkerne isoliert (3.14.1). Die Extraktion erfolgte mit 30 mM NaCl. Die DNA-Replikation wurde unter Standardbedingungen durchgeführt (3.14.3).

4.2.3 Einfluß von Hydroxyharnstoff

Es ist beschrieben, daß Hydroxyharnstoff die Synthese von DNA hemmt, aber RNA- und Proteinsynthese nicht beeinflußt. (Adams und Lindsay, 1967, Nordenskjöld und Krakoff, 1968, Skoog und Nordenskjöld, 1971, Brandt et al., 1972). Nach Entfernung des Inhibitors läuft die DNA-Synthese normal ab (Sussenbach und van der Vliet, 1973). Um zu verhindern, daß die IN VITRO-DNA-Synthese an teilweise replizierten, endogenen viralen DNA-Molekülen, die bei der Salzextraktion eventuell mit aus den Zellkernen eluiert werden, abläuft, und um eine Akkumulation der Proteine, die für die DNA-Replikation notwendig sind, zu erreichen, wurden der Zellsuspension zwei Stunden nach Infektion 10 mM Hydroxyharnstoff zugesetzt.

Abb. 19 zeigt den Unterschied in der Kinetik der DNA-Replikation IN VITRO, wenn man Extrakte aus ungehemmten, Ad 2-infizierten Zellen oder solchen, bei denen die DNA-Replikationen durch Zugabe von 10 mM Hydroxyharnstoff gehemmt war, vergleicht. Extrakte aus Zellen, bei denen die DNA-Replikation nicht durch Hydroxyharnstoff gehemmt war, zeigen im Vergleich zu hydroxyharnstoffgehemmten eine um 50 % reduzierte DNA-Syntheserate.

Es erscheint möglich, daß frühe Proteine, die für die DNA-Replikation notwendig sind, im Falle der ungehemmten Extrakte bereits für die virale DNA-Replikation in den HeLa-Zellen teilweise verbraucht worden sind, wogegen in den gehemmten Zellen diese Proteine akkumuliert worden sind. Von Hydroxyharnstoff, der zur Messung von Reparatursynthese weit verbreitet ist, wird allgemein angenommen, daß er keine reparaturinduzierenden Eigenschaften besitzt, weil er nicht mit DNA in intakten Zellen reagiert, sondern die Ribonukleotid-Reduktase hemmt und damit die endogenen Nukleotid-Pools der Zelle erschöpft (Young und Hodas, 1964, Young et al., 1967). Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen von Smith und Hanawalt (1977), die beschreiben, daß nach Zugabe von Hydroxyharnstoff zu UV-bestrahlten menschlichen Zellen die Reparatursynthese um 25 - 40 % erhöht wird.

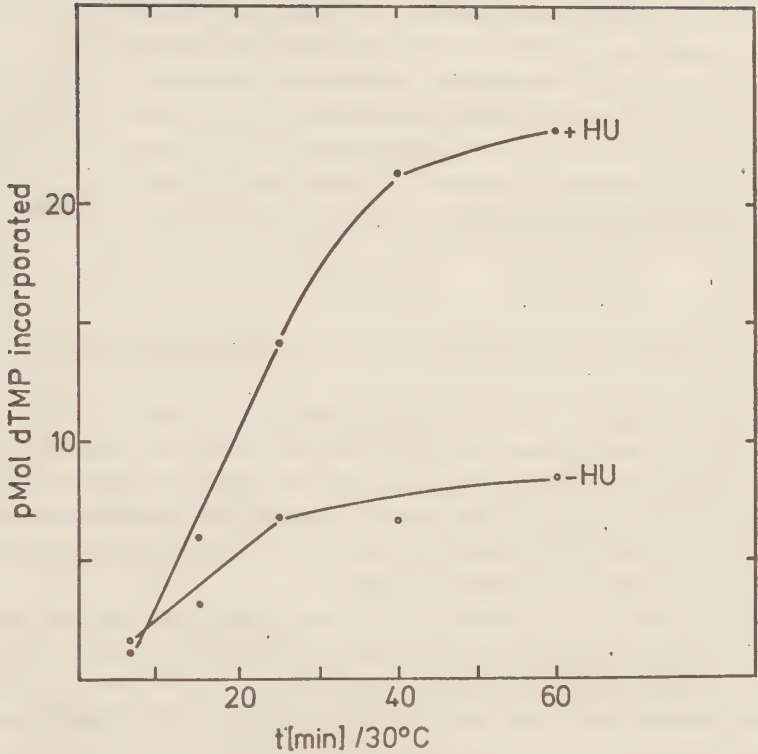


Abbildung 19: Kinetiken der DNA-Replikation IN VITRO unter Verwendung von Extrakten aus hydroxyharnstoffgehemmten (●—●) und ungehemmten HeLa-Zellen (○—○) HeLa-Zellen wurden mit einer Multiplizität von 100 PFU/Zelle mit Ad 2 infiziert. 2 hpi wurden einer von zwei Zellsuspensionen 10 mM Hydroxyharnstoff (HU) zugegeben und die Zellkerne nach 18 h isoliert (3.14.1). Extraktion und IN VITRO-DNA-Synthese erfolgten unter Standardbedingungen (3.14.2, 3.14.3).

Andrae und Greim (1979) beobachten eine hydroxyharnstoffinduzierte Reparatursynthese in menschlichen Lymphoblastoidzellen, wenn man die Zellen mit Lebermikrosomen und NADPH inkubiert. Durch Katalase wird die hydroxyharnstoffinduzierte Reparatursynthese um mehr als 95 % gehemmt, was darauf hindeutet, daß Wasserstoffperoxid, das in Gegenwart des

stoffwechselaktivierenden Systems von Hydroxyharnstoff gebildet wird, an der Beschädigung der DNA beteiligt ist (Andrae und Greim, 1979). Man kann annehmen, daß unter den verwendeten Bedingungen zur Isolierung von Ad 2-infizierten Zellkernen Mikrosomen nicht vollständig abgetrennt werden. Inwieweit deshalb die Erhöhung des ^3H -dTTP-Einbaues bei der Ad 2-DNA-Replikation IN VITRO darauf zurückzuführen ist, daß durch Hydroxyharnstoff die Reparatursynthese erhöht wird, muß noch geprüft werden.

4.2.4 Optimierung der Bedingungen für die DNA-Replikation IN VITRO

Aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen, deren DNA-Synthese durch 10 mM Hydroxyharnstoff gehemmt war, wurden etwa 20 Stunden nach Infektion Kerne isoliert und daraus mit 30 mM Kochsalz ein Kernextrakt eluiert. Diese Extrakte und solche, die nach derselben Methode aus uninfizierten Zellen gewonnen worden waren, wurden auf ihre Fähigkeit, DNA an einer zugesetzten Matrize zu synthetisieren, geprüft.

Verwendet man für die DNA-Synthese IN VITRO uninfizierte Extrakte, wird keine DNA synthetisiert. Man kann ebenfalls keine DNA-Synthese messen, wenn man dem Testansatz keine DNA zusetzt.

Im Gegensatz dazu zeigen Ad2-infizierte Extrakte eine hohe DNA-Syntheserate, wenn man sie mit einem DNA-Proteinkomplex, der nach der Methode von Rekosh et al. (1977) aus gereinigten Virionen isoliert und gereinigt worden war, inkubiert.

Benützt man als Matrize Ad 2-DNA, bei der das terminale Protein vorher durch Proteinase K-Verdauung entfernt worden war, wird die DNA-Synthese um 70 - 80 % reduziert (Abb. 20).

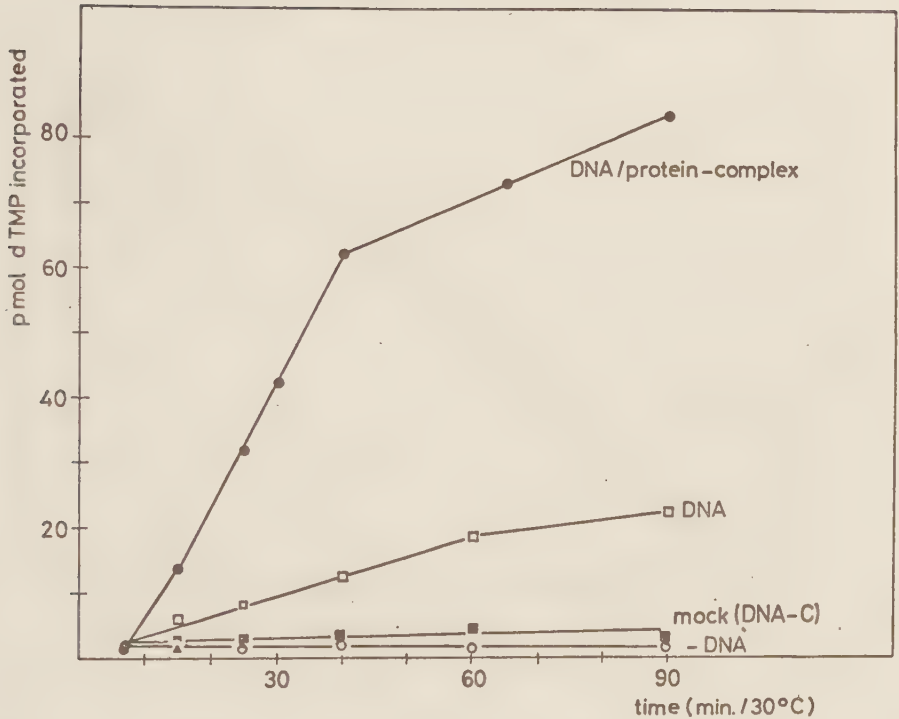


Abbildung 20: Substratabhängigkeit der Ad 2-DNA-Synthese IN VITRO
Die Kinetiken der DNA-Replikation wurden unter Standardbedingungen gemessen (3.14.3). Die Reaktionen wurden durchgeführt mit Ad 2-DNA-Proteinkomplex (●—●), proteinfreier DNA (□—□), in Abwesenheit von DNA (○—○) und mit Ad 2-DNA Proteinkomplex und Extrakten aus Ad 2-infizierten Zellen (●—●) oder uninfizierten Zellen(■—■). Die Proteinkonzentration im Test betrug 3.5 mg/ml, die DNA-C-Konzentration 8 µg/ml, DNA-Konzentration 10 µg/ml.

Verwendet man als Matrize nicht Ad 2 DNA-Proteinkomplex, sondern Ad 5-DNA-Proteinkomplex oder Ad FL-DNA-Proteinkomplex aus Mausadenovirus (4.2.7) und verwendet für die IN VITRO-DNA-Synthese Extrakten aus Ad 2-infizierten Zellen, sind die Kinetiken der DNA-Synthese nicht signifikant unterschieden (Abb. 21).

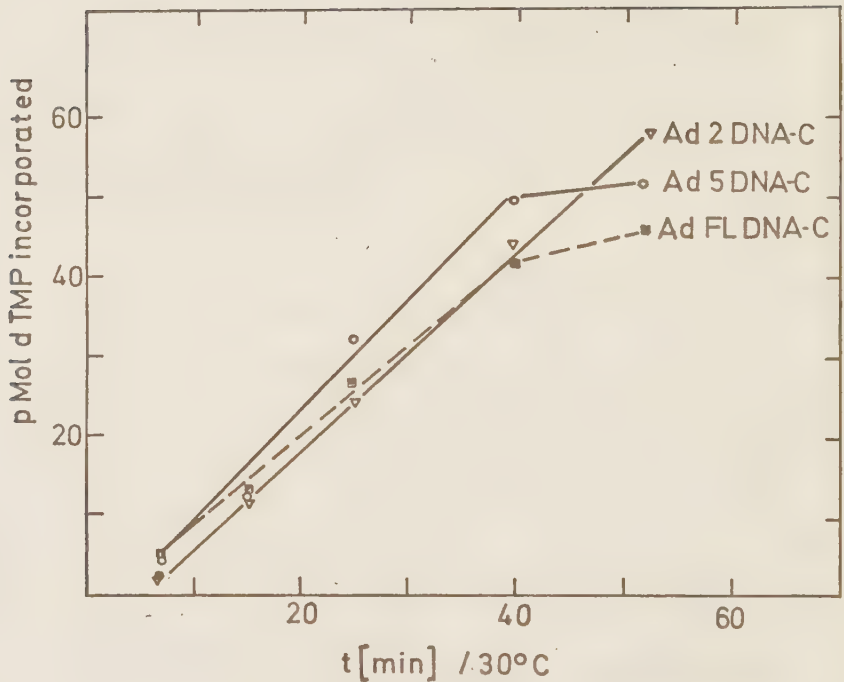


Abbildung 21: Kinetiken der DNA-Replikation IN VITRO unter Verwendung von verschiedenen Ad-DNA-Proteinkomplexen. Extrakte wurden nach Standardbedingungen aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen gewonnen (3.14.1). Die Standardreaktion (3.14.3) wurde mit Ad 2-DNA-Proteinkomplex (∇), Ad 5-DNA-Proteinkomplex ($\circ$) oder Ad FL-DNA-Proteinkomplex ($\blacksquare$) durchgeführt.

Setzt man steigende Mengen an Ad 2-DNA-Proteinkomplex als Substrat in den IN VITRO-Ansatz ein, erhöht sich auch die DNA-Syntheserate, bis bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{l/ml}$ Testvolumen keine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mehr beobachtet werden kann (Abb 22). Es wurden deshalb in den IN VITRO-Replikationssystemen mit DNA-Konzentrationen von 8 - 10 $\mu\text{g/ml}$ gearbeitet.

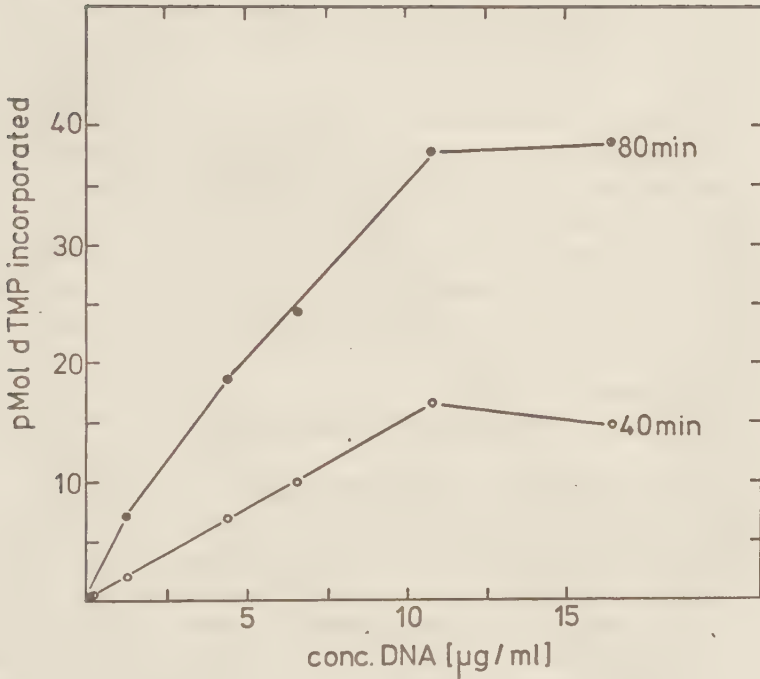


Abbildung 22: Abhängigkeit der DNA-Replikation IN VITRO von der DNA-Konzentration.

DNA-Replikation wurde unter Standardbedingungen (3.14.3) mit den angegebenen Mengen an Ad 2-DNA-Proteinkomplex gemessen. Nach 40 Minuten (○—○) und 80 Minuten (●—●) wurde der Einbau von Nukleotiden in DNA als TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.

Nach der Methode von Lowry (1951) beträgt die Proteinkonzentration der Kernextrakte 5 - 10 mg/ml. Mit steigenden Mengen an Extrakten, die man für die IN VITRO-Replikation verwendet, erhöht sich auch die Geschwindigkeit der DNA-Synthese (Abb. 23).

Es wurde deshalb mit Proteinkonzentrationen von 2.5 - 3.0 mg/ml im Test gearbeitet.

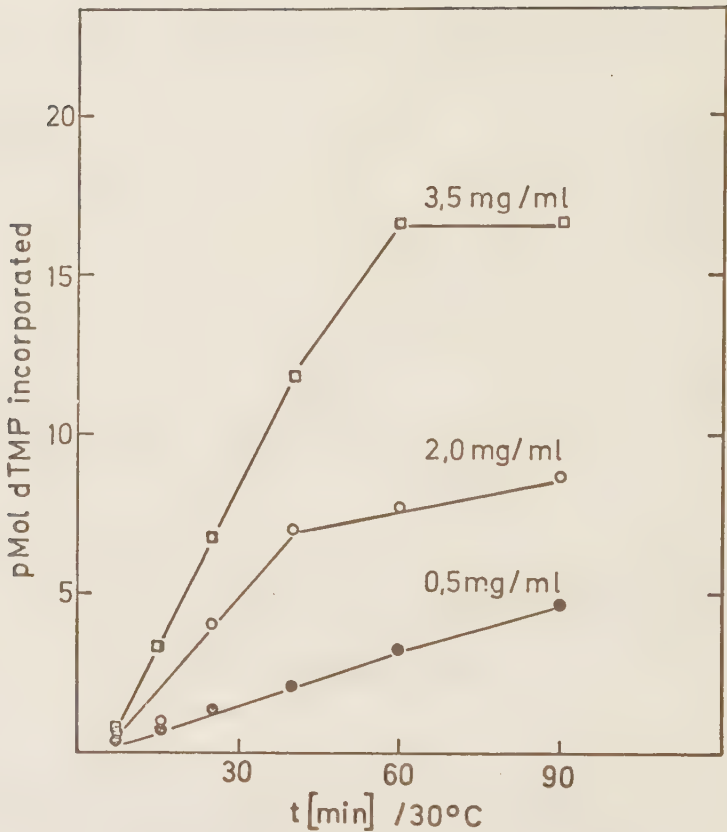


Abbildung 23: Abhängigkeit der DNA-Replikation IN VITRO von der Proteinkonzentration.

Die Kinetiken der DNA-Replikation wurden unter Standardbedingungen (3.14.3) mit einer Proteinkonzentration von 0.5 mg/ml (●—●), 2.0 mg/ml (○—○) oder 3.5 mg/ml (□—□) gemessen.

Wie zu erwarten war, ist die DNA-Synthese IN VITRO temperaturabhängig (Abb. 24). Maximalen Einbau von dTMP in säureunlösliches Material erhält man, wenn man den Standardreaktionsansatz bei 30°C oder 37°C inkubiert.

Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C verläuft die Reaktion doppelt so schnell wie bei 30°C. Sie ist jedoch höchstens 20 Minuten linear und kommt nach 45 Minuten zum Stillstand. Inkubiert man hingegen bei 30°C, verläuft die Reaktion für 40 bis 60 Minuten linear, und wird nach 60 bis 90 Minuten beendet.

Bei einer Reaktionstemperatur von 25°C kann man einen linearen Anstieg der DNA-Synthese bis etwa 60 Minuten beobachten. Bei Beendigung der Reaktion nach etwa 90 Minuten ist im Vergleich zu den Reaktionsprodukten von 30° und 37°C etwa 60 % DNA synthetisiert. Bei einer Inkubationstemperatur von 40°C wird die DNA-Syntheserate um etwa 80 % reduziert. Es ist anzunehmen, daß für die DNA-Replikation notwendige Proteine bei dieser Temperatur unter IN VITRO Bedingungen denaturieren und deshalb inaktiv sind.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die optimale Reaktionstemperatur für die Replikationsversuche IN VITRO mit 30°C angesetzt.

Aus Untersuchungen mit den spezifischen Inhibitoren Aphidicolin (Ikegami et al., 1978) und ddTTP gibt es Hinweise, daß die zellulären DNA-Polymerasen α und γ an der Replikation von Ad DNA beteiligt sind (Arens et al, 1977, Brison et al., 1977, Frenkel, 1978, Abboud und Horwitz, 1979). Von diesen Enzymen ist bekannt, daß sie zur Entfaltung der maximalen Aktivität Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Kationen benötigen. Wenn das IN VITRO-Replikationssystem die IN VIVO-Situation widerspiegelt, müssen diese beiden Enzyme auch bei der DNA-Synthese IN VITRO aktiv sein, was gleichzeitig einer Abhängigkeit der Reaktion von der Mg^{2+} -Konzentration entspricht. Es wurde deshalb die Abhängigkeit der DNA-Replikation IN VITRO von der Mg^{2+} -Konzentration gemessen.

Inkubiert man den Standardreaktionsansatz mit steigenden Mengen an $MgCl_2$, so erhält man bis zu einer Konzentration von 4 mM eine Steigerung der DNA-Synthese, die aber durch weitere Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration nicht mehr beeinflußt werden kann (Abb. 25).

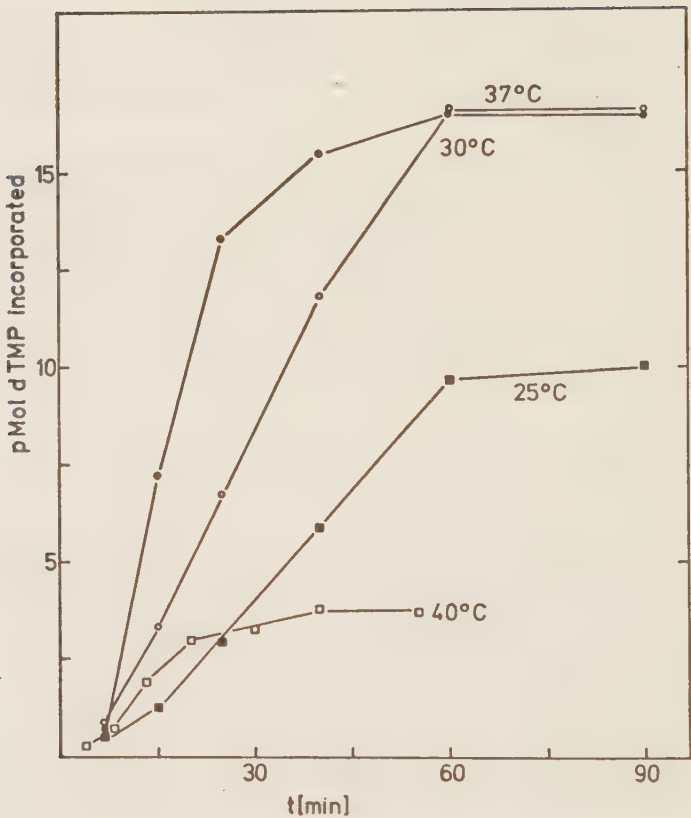


Abbildung 24: Temperaturabhängigkeit der DNA-Replikation IN VITRO
Die Kinetiken der Ad 2-DNA-Replikation wurden unter Standardbedingungen (3.14.3) bei 25° (■—■), 30° (○—○), 37° (●—●) oder 40°C (□—□) gemessen.

Es ist bekannt, daß die DNA-Replikation von ATP stimuliert wird (Moses et al., 1970, van der Vliet und Sussenbach, 1972, Yamashita et al, 1975, Frenkel, 1978). Es wurde deshalb die Abhängigkeit der DNA-Replikation IN VITRO von der ATP-Konzentration gemessen. Einen optimalen Einbau von ^3H dTMP in säureunlösliches Material erhält man, wenn die IN VITRO-DNA-Replikation in Gegenwart von 1 - 2 mM ATP durchgeführt wird (Abb. 26).

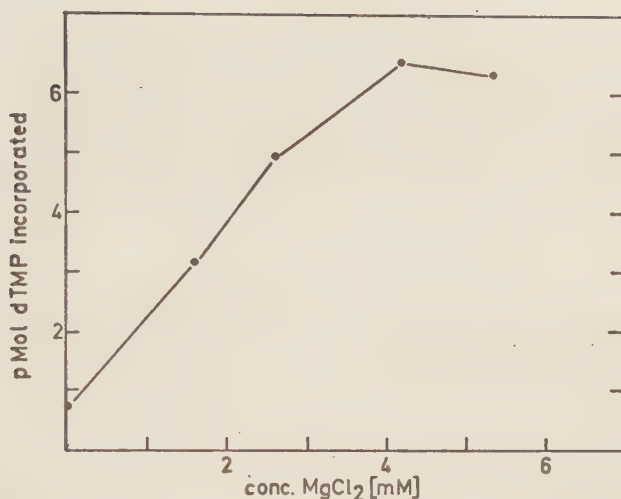


Abbildung 25:

Abhängigkeit der Ad 2-DNA-Replikation IN VITRO von der $MgCl_2$ -Konzentration. DNA-Replikation wurde unter Standardbedingungen (3.14.3) mit den angegebenen Mengen an $MgCl_2$ gemessen. Nach 40 minutiger Inkubation bei $30^\circ C$ wurde der Einbau von Nukleotiden in DNA als TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.

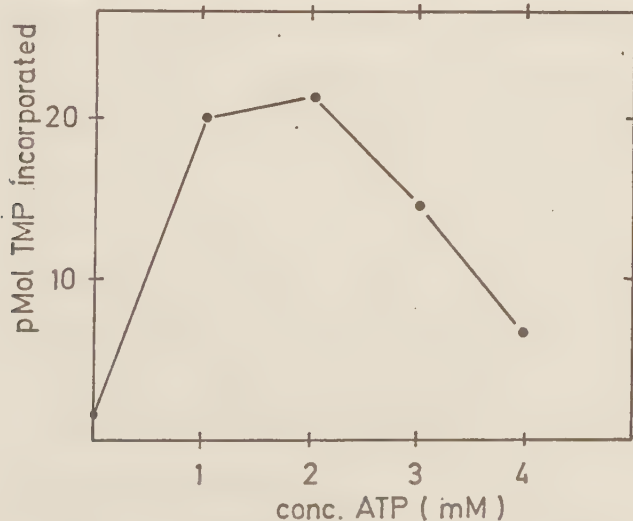


Abbildung 26:

Abhängigkeit der IN VITRO-DNA-Synthese von der ATP-Konzentration. DNA-Replikation wurde unter Standardbedingungen (3.14.3) mit den angegebenen Mengen an ATP gemessen. Nach 45 minutiger Inkubation bei $30^\circ C$ wurde der Einbau von Nukleotiden in DNA als TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.

Neben den eben diskutierten Faktoren sind für die DNA-Replikation IN VITRO die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate notwendig. Eine Zugabe von CTP, GTP und UTP führte zu keiner Stimulierung der DNA-Synthese. Auch erbrachte der Zusatz eines ATP-regenerierenden Systems (Phosphoenolpyruvat + Pyruvatkinase) keine signifikante Beschleunigung der Reaktion (Tab. 6).

Bedingungen	Aktivität (%)
Komplett (Standardtest)	100
proteinfreie DNA (8 µg/ml)	26
- DNA-Proteinkomplex	0
- dATP, dCTP, dGTP	43
- ATP	11
+ CTP, GTP, UTP (je 50 µM)	95
- MgCl ₂	0
+ Phosphoenolpyruvat (4 mM)	115
+ Pyruvatkinase (10 µg/ml)	

Tabelle 6: Notwendige Faktoren für die Ad 2-DNA-Replikation IN VITRO
Die DNA-Syntheseaktivität von Ad 2-infizierten Kernextrakten wurden, wie unter Methoden beschrieben, bei 30°C gemessen.

In einen Standardreaktionsansatz werden 262 ng DNA eingesetzt, was einer Konzentration von 175 pMol dTMP entspricht. Nach 60 minutiger Inkubation werden unter optimalen Bedingungen 33 pMol ³H-dTMP in säureunlösliches Material eingebaut, was einer Replikation von etwa 20 % der eingesetzten Matrizen-DNA entspricht. Die spezifische Aktivität des Einbaus beträgt 2 pMol dTMP/µg DNA/min. Von den 175 pMol dTMP an eingesetzter DNA sind nach einstündiger Inkubation noch 163 pMol säurefällbar, d.h. daß während der Inkubation 12 pMol dTMP abgebaut wurden (Abb. 27). Von der Annahme ausgehend, daß DNA-Reparatur über das gesamte Genom mit gleicher Häufigkeit erfolgt, sollten aus den beiden Strängen der viralen DNA je 6 pMol dTMP abgebaut worden sein. Gleichzeitig werden 33 pMol ³H-dTMP inkorporiert. Wenn man nun postuliert, daß die während der Inkubation abgebauten Nukleotide durch Reparatursynthese wieder ersetzt werden, sollten von den 33 pMol ³H-dTMP 12 pMol für Reparatursynthese in die Matrizen-DNA eingebaut und 21 pMol für die Neusynthese von DNA verwendet worden sein. 64 % der inkorporierten dTMP Moleküle müßten daher für die Neusynthese von DNA und 36 % für die Reparatursynthese der Matrizen-DNA verbraucht worden sein.

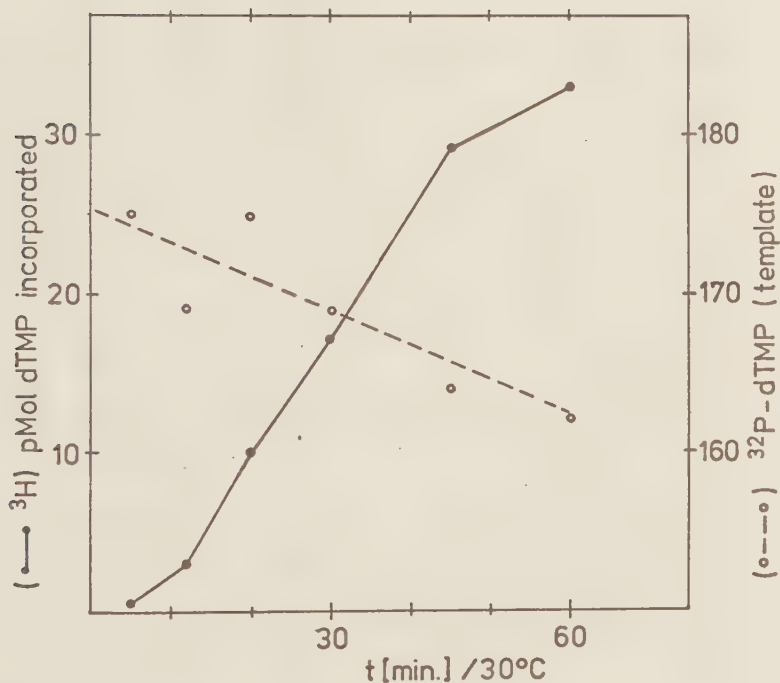


Abbildung 27: Verhalten der Ad 2-DNA-Matrize während der IN VITRO-DNA-Replikation.
Die Kinetiken der Ad 2-DNA-Replikation wurden unter Standardbedingungen (3.14.3) gemessen. Als Matrize wurden 262 ng (= 175 pMol dTMP) ^{32}P Ad 2-DNA-Proteinkomplex eingesetzt. Der Einbau von ^3H -dTMP in DNA (1 pMol ^3H -dTMP = 300 cpm) und der Abbau von ^{32}P -Nukleotiden aus der Matrizen-DNA wurde als säurefällbare Radioaktivität bestimmt.

4.2.5 Produkt der DNA-Synthese

Nachdem gezeigt worden war, daß Ad 2-infizierte Kernextrakte unter optimalen Bedingungen in der Lage sind, ^3H -dTMP in säureunlösliches Material einzubauen, mußte gezeigt werden, daß es sich bei dem entstehenden Produkt tatsächlich um neusynthetisierte virale DNA handelt.

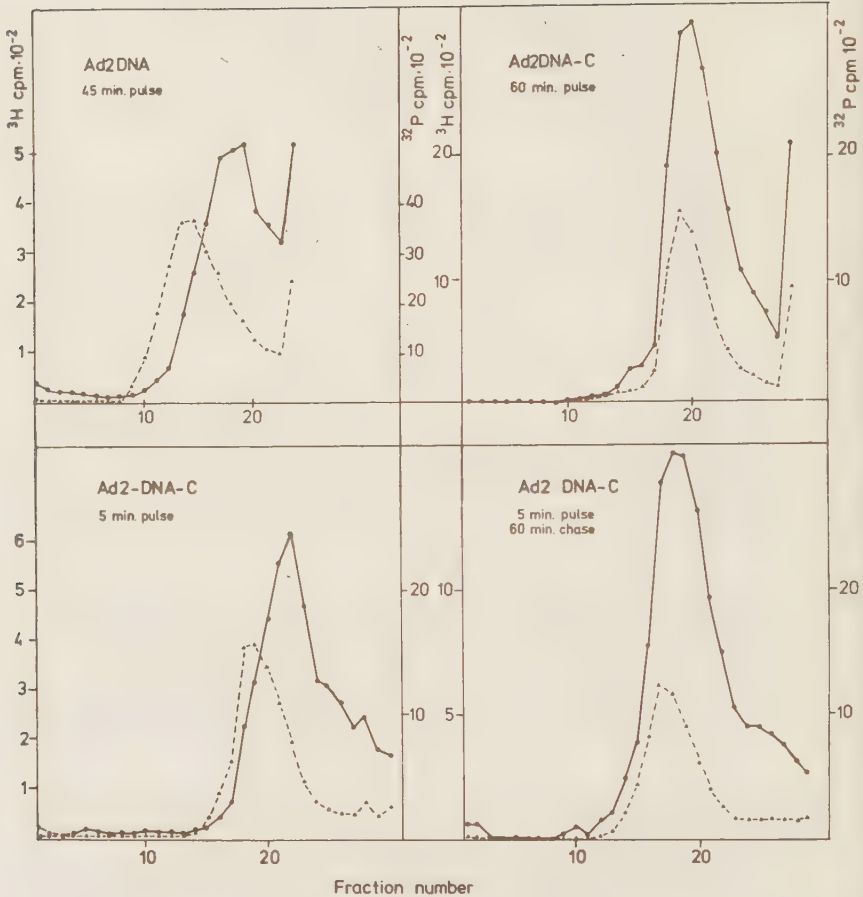


Abbildung 28:

Analyse von IN VITRO synthetisierter DNA durch Sedimentation im alkalischen Sucrosegradienten.

DNA-Replikation wurde unter Standardbedingungen (3.14.3) mit Ad2-DNA oder Ad 2-DNA-Proteinkomplex als Matrice durchgeführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden 50 μl Proben auf alkalischen Sucrosegradienten lysiert und nach Zugabe von ^{32}P -Ad 2-Marker-DNA zentrifugiert (3.12.1). Die ^3H -dTTP-Konzentration war 15 μM . In den "chase"-Reaktionsansatz wurden nach fünfminütiger Inkubation 300 μM "kaltes" dTTP gegeben.

4.2.5.1 Analyse der IN VITRO synthetisierten DNA durch Sedimentation im alkalischen Sucrosegradienten.

Zunächst wurde, um die Größe der Syntheseprodukte zu bestimmen, Sedimentationsanalysen durchgeführt (Abb. 28).

DNA, die nach einem 60 minütigen Puls isoliert worden war, sedimentiert im alkalischen Sucrosegradienten mit intakter viraler Marker-DNA. Nach einem fünfminütigen Puls ist die Radioaktivitätsverteilung heterogen, doch kann sie durch einen 60 minütigen "chase" mit der zwanzigfachen Menge an unmarkiertem dTTP wieder in intakte virale DNA übergeführt werden. Benützt man statt Ad 2 DNA-Proteinkomplex proteinfreie DNA als Matrize, so führt die geringe DNA-Synthese zu niedermolekularem Material.

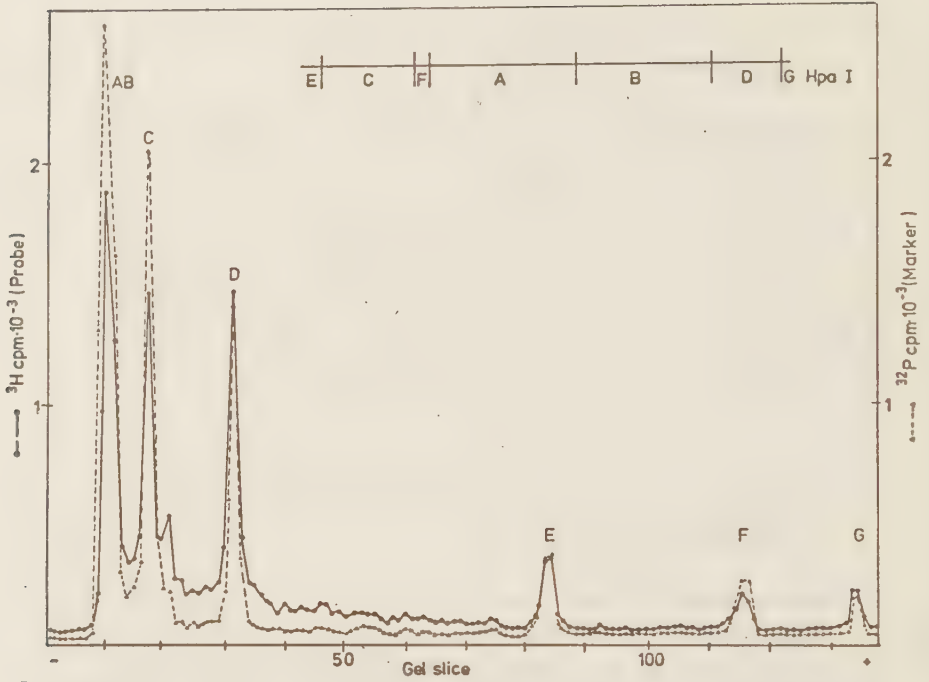
4.2.5.2 Analyse der IN VITRO synthetisierten DNA durch Fragmentierung mit Restriktionsenzymen

Zur weiteren Charakterisierung wurde die neusynthetisierte DNA nach Proteinase K-Behandlung isoliert und in Gegenwart von ^{32}P -Marker DNA mit dem Restriktionsenzym Hpa I oder einer Mischung aus Eco RI und Bam HI gespalten und die Fragmente in einem Mischgel von 0.8 % Agarose und 1.4 % Polyacrylamid aufgetrennt. Dabei ergaben sich die für Ad 2 typischen Fragmentierungsmuster (Abb. 29).

Zu Abbildung 29: Gelelektrophorese von IN VITRO synthetisierter DNA nach Fragmentierung mit den Restriktionsendonukleasen Hpa I und Eco RI + Bam HI.

Ad 2 DNA-Replikation IN VITRO wurde unter Standardbedingungen durchgeführt (3.14.3). Nach 30 minütiger Inkubation bei 30°C wurde DNA isoliert (3.14.3) und in Gegenwart von ^{32}P -Ad2-Marker-DNA mit Hpa I (A) oder einer Mischung aus Eco RI und Bam HI (B) fragmentiert (3.6) und die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.8.1). Die Anode befand sich rechts.

●—● ^3H cpm der IN VITRO synthetisierten DNA,
▲----▲ ^{32}P -cpm homogen markierter Ad 2 DNA.



4.2.5.3 Lokalisierung der Replikationsursprungsorte

Auf Grund des Replikationsmodells der "Displacementsynthese" (Lechner und Kelly, 1977) lassen sich 2 Forderungen ableiten:

- 1) Beide molekularen Enden des viralen Genoms sollten Initiationsorte für die DNA-Replikation darstellen, so daß die Neusynthese beider viralen Stränge über die gesamte Länge des Genoms in der Richtung vonstatten geht, die mit der 5'→3'-Richtung des jeweiligen Tochterstranges übereinstimmt. Daraus ergibt sich die 2. Forderung:
- 2) Bei der Markierung replizierender neunitierter DNA-Moleküle sollte der Einbau an Radioaktivität strangspezifisch erfolgen. Es sollten an beiden Genomenden jeweils nur der Strang markiert werden, der das 5'-Ende des viralen Genoms trägt.

Diese Voraussagen konnten IN VIVO experimentell nachgeprüft werden (Abb. 14) (Weingärtner, 1977, Winnacker, 1978, Lechner und Kelly, 1977) und wurden durch Synchronisationsexperimente an DNA-negativen Mutanten bestätigt (4.1.7, 4.1.8) (Ariga und Shimojo, 1977, Sussenbach und Kuijk, 1978).

Wenn das hier beschriebene IN VITRO-System den tatsächlichen Reaktionsverlauf IN VIVO widerspiegelt, so müssen diese Forderungen auch unter IN VITRO-Bedingungen bestätigt werden können.

Wählt man die Pulsdauer in einem IN VITRO Replikationsansatz so, daß sie kürzer ist als eine Replikationsrunde, sollte die neusynthetisierte DNA präferentiell an den beiden Replikationsursprungsorten markiert sein. Um diese Forderung zu prüfen, wurde IN VITRO 5, 20 und 60 Minuten bei 30°C mit ^3H -dTTP pulsmarkiert, die DNA isoliert und in Gegenwart von ^{32}P -Marker-DNA mit dem Restriktionsenzym Hpa I fragmentiert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde die relative Radioaktivitätsverteilung in den einzelnen Fragmenten bestimmt.

In Abb. 30 ist die Verteilung der neueingebauten Radioaktivität in pulsmarkierten viralen DNA-Molekülen entlang dem Ad 2 Genom für verschiedene Markierungsperioden (5, 20 und 60 Minuten) als relativer Radioaktivitätseinbau in die Ad 2-DNA-Fragmente der Restriktionsendonuklease Hpa I dargestellt.

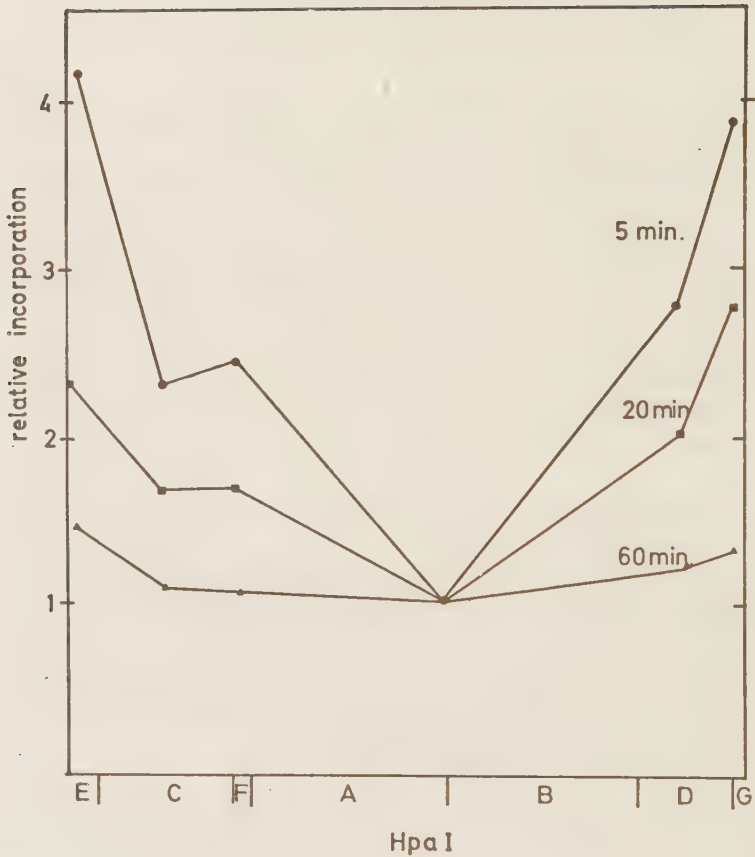


Abbildung 30:

Relativer Radioaktivitätseinbau in Restriktionsfragmente von IN VITRO synthetisierter DNA.

DNA-Replikation wurde unter Standardbedingungen durchgeführt (3.14.3). Nach 5 (●—●), 20 (■—■) oder 60 Minuten (▲—▲) wurde DNA isoliert und in Gegenwart von ^{32}P -Ad 2 DNA mit dem Restriktionsenzym Hpa I fragmentiert (3.6). Nach der elektrophoretischen Auftrennung (3.8.1) wurde für jedes Fragment die Menge an ^3H - und ^{32}P -Radioaktivität bestimmt, auf den unterschiedlichen Thymidingehalt der einzelnen Fragmente hin korrigiert und als Funktion der Lage der Fragmente auf dem Ad 2- Genom als relativer Radioaktivitätseinbau dargestellt. Die Werte des relativen Einbaus sind auf die nicht aufgetrennten Fragment A und B ($^3\text{H}/^{32}\text{P}$ AB = 1) bezogen.

Vergleichbar mit dem U-förmigen Verteilungsmuster, das nach Initiation der DNA-Replikation bei der Mutante H2 ts214 an replizierenden DNA-Molekülen gefunden wurde (Abb. 13), entstehen auch unter IN VITRO-Bedingungen Gradienten des relativen Radioaktivitätseinbaus, deren Steigung nach kurzer Pulsdauer (5 Minuten) am ausgeprägtesten ist und erwartungsgemäß mit Verlängerung der Inkubationszeit abnimmt. Nach einem 60 minütigen Puls findet man eine annähernd gleichmäßige Verteilung des relativen Radioaktivitätseinbaus über das gesamte Genom, was bedeutet, das unter IN VITRO-Standardbedingungen eine Replikationsrunde etwa 60 Minuten beträgt. Durch die U-förmige Verteilung des relativen Radioaktivitätseinbaus entlang dem viralen Genom wird unter IN VITRO-Bedingungen bestätigt, daß beide molekularen Enden des Adenogenoms als Ursprungsort für die DNA-Replikation dienen. Diese Ergebnisse bestätigen auch, daß der Einbau von Radioaktivität auch auf Neusynthese von DNA zurückzuführen ist. Fände unter IN VITRO-Bedingungen ausschließlich Reparatursynthese statt, müßte man auch bei kurzen Pulsen mit ^3H -dTTP eine gleichmäßige Radioaktivitätsverteilung über das virale Genom erwarten.

4.2.5.4 Analyse der Strangzugehörigkeit von neueingebauter Radioaktivität

Zur Untersuchung inwieweit die Radioaktivität spezifisch in die neusynthetisierte DNA, d.h. die DNA, die das 5'-Ende des viralen Genoms trägt, eingebaut wird, wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung Fragmente aus dem Gel eluiert und mit Hilfe von Alkali denaturiert und mittels Gelelektrophorese in die beiden komplementären Einzelstränge getrennt (3.8.2) und die Verteilung der Pulsmarkierung in den komplementären Fragmentsträngen gemessen (Weingärtner et al., 1976).

In Abbildung 31 sind die elektrophoretischen Strangtrennungen von Restriktionsfragmenten des molekularen linken Endes (Hpa I-E, Hpa I-C und Bam HI-B) und des molekularen rechten Endes (Hpa I-G und Hpa I-D) des viralen Genoms dargestellt.

Die Radioaktivität ist asymmetrisch auf die komplementären Stränge der genannten Restriktionsfragmente verteilt, wenn als Vergleich die 32 P-markierten Markerstränge verwendet werden. Bei allen Fragmenten zeichnet sich der jeweils schnell wandernde als präferentiell markiert aus.

Die Menge an Radioaktivität in den komplementären Strängen wurde bestimmt, in dem die Gesamtradioaktivität der getrennten Fragmentstränge ermittelt wurden. Für die einzelnen Stränge fanden jeweils die Gelfractionen Berücksichtigung, die in Abb. 31 durch Striche unter den getrennten Strängen gekennzeichnet sind.

In Tabelle 7 sind für fünf Restriktionsfragmente die Radioaktivität der jeweiligen "schnellen" bzw. "langsamen" Fragmentstränge aufgelistet. Während das Verhältnis des schnellen zum langsamen Stranges in den ^{32}P -markierten Fragmenten aus der Marker-DNA jeweils ungefähr 1 war, betrug es bei den ^3H -markierten aus einem 30 minutigen Puls 3 - 4 : 1. Berücksichtigt man bei der Stranganalyse den unterschiedlichen, relativen Thymidingehalt der komplementären Fragmentstränge (Weingärtner et al., 1976), resultieren für das Radioaktivitätsverhältnis (schneller : langsamer Strang) Werte, die um 3 liegen.

Unter Berücksichtigung der Strangzuordnung der schnellen Fragmentstränge zu den intakten Einzelsträngen (Sharp et al., 1974, Weingärtner et al., 1976) (Abb. 5) wird deutlich, daß am linken Genomende der virale l-Strang und am rechten Genomende der virale r-Strang den Hauptanteil der Markierung tragen. Die Markierung replizierender DNA-Moleküle befindet sich somit vorwiegend in dem dem 5'-Ende entsprechenden Einzelstrang.

Daß auch in die jeweils komplementären Fragmentstränge - wenn auch deutlich weniger - Radioaktivität eingebaut wird, kann dadurch erklärt werden, daß neben der DNA-Replikation IN VITRO vermutlich auch Reparatursynthese abläuft, die keine Strangspezifität aufweisen sollte (4.2.4) (Abb. 27).

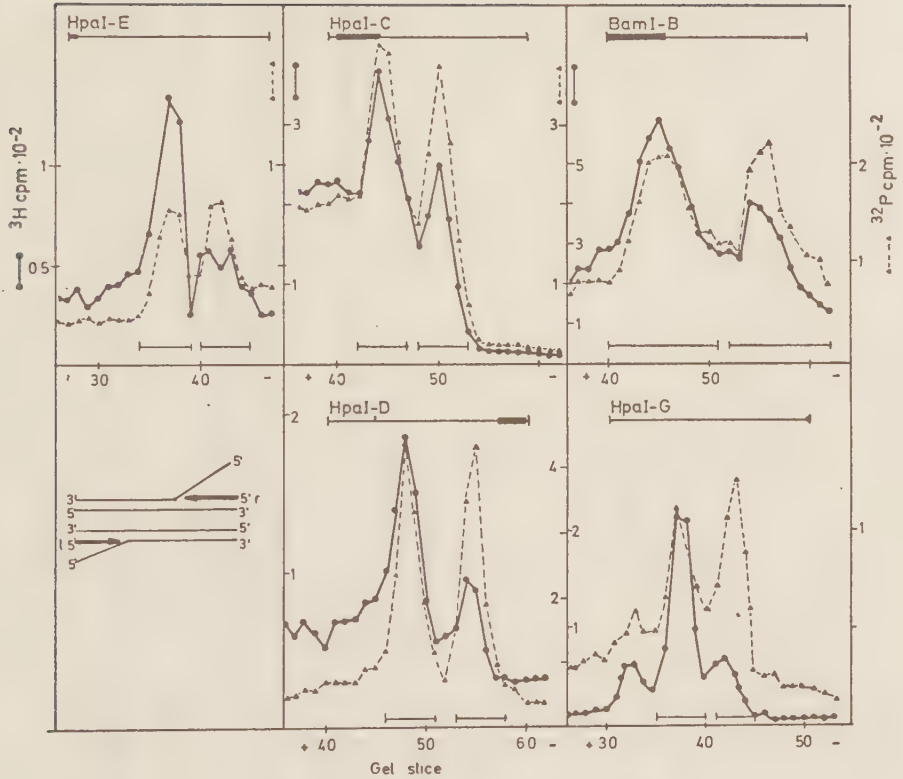


Abbildung 31:

Elektrophoretische Strangtrennungen von Restriktionsfragmenten IN VITRO synthetisierter DNA.

DNA Replikation wurde unter Standardbedingungen durchgeführt (3.14.3).

Nach 30 minutiger Inkubation wurde DNA isoliert und mit Hpa I oder Eco RI + Bam HI fragmentiert. Die aus dem Gel isolierten Restriktionsfragmente Hpa I-E, Hpa I-C, Hpa I-D, Hpa I-G und Bam HI-B wurden elektrophoretisch in die beiden Komplementärstränge aufgetrennt (3.8.2). Die Striche unter den getrennten Fragmentsträngen bezeichnen jene Gelfraktionen, die zur Bestimmung des Radioaktivitätsverhältnisses (Tab. 7) verwendet wurden. Die Anode befand sich links.

●—● $^3\text{H cpm}$ der IN VITRO synthetisierten DNA,

▲---▲ $^{32}\text{P cpm}$ homogen markierter Ad 2 DNA.

Fragment	Stränge	³² P Marker			³ H-Probe				
		³² P-cpm	b) Verh.	% Radioaktivität i.s-Strang	³ H-cpm	b) Verh.	% Radioaktivität i.s-Strang	c) Rel.Thymidin-gehalt des S-Stranges	d) korr. Verh.
Hpa I-G	schnell langsam	293	0.96	49.1	429	4.5	81.9	63	3.6
		304			95				
Hpa I-D	schnell langsam	982	0.99	49.7	364	3.0	75.1	n.b.	
		993			121				
Hpa I-E	schnell langsam	166	1.09	52.2	291	3.6	78.4	58.4	3.1
		152			80				
Hpa I-C	schnell langsam	736	0.96	49.1	523	3.5	77.7	61.3	2.9
		763			150				
Bam HI-B	schnell langsam	590	1.07	51.7	2075	3.9	79.4	n.b.	
		550			538				

Tabelle 7: Radioaktivitätsverteilung in gelelektrophoretisch getrennten Strängen von Restriktionsfragmenten
IN VITRO synthetisierter DNA

- a) Die Striche in Abb. 31 unter den getrennten Strängen der verschiedenen Restriktionsfragmente zeigen die Gel-fractionen an, die bei der Bestimmung der Gesamtradioaktivität der Fragmentstränge Berücksichtigung fanden.
- b) Radioaktivitätsverhältnis des schnellen zum komplementären langsamen Fragmentstrang.
- c) Die Werte für den relativen Thymidingehalt der schnellen Fragmentstränge wurde von Weingärtner et al., 1976 übernommen.
- d) Radioaktivitätsverhältnis des schnellen zum komplementären langsamen Fragmentstrang, nachdem Korrekturen für den unterschiedlichen relativen Thymidingehalt der einzelnen Stränge vorgenommen waren.
- s-Strang = schneller Strang,
n.b. = nicht bestimmt

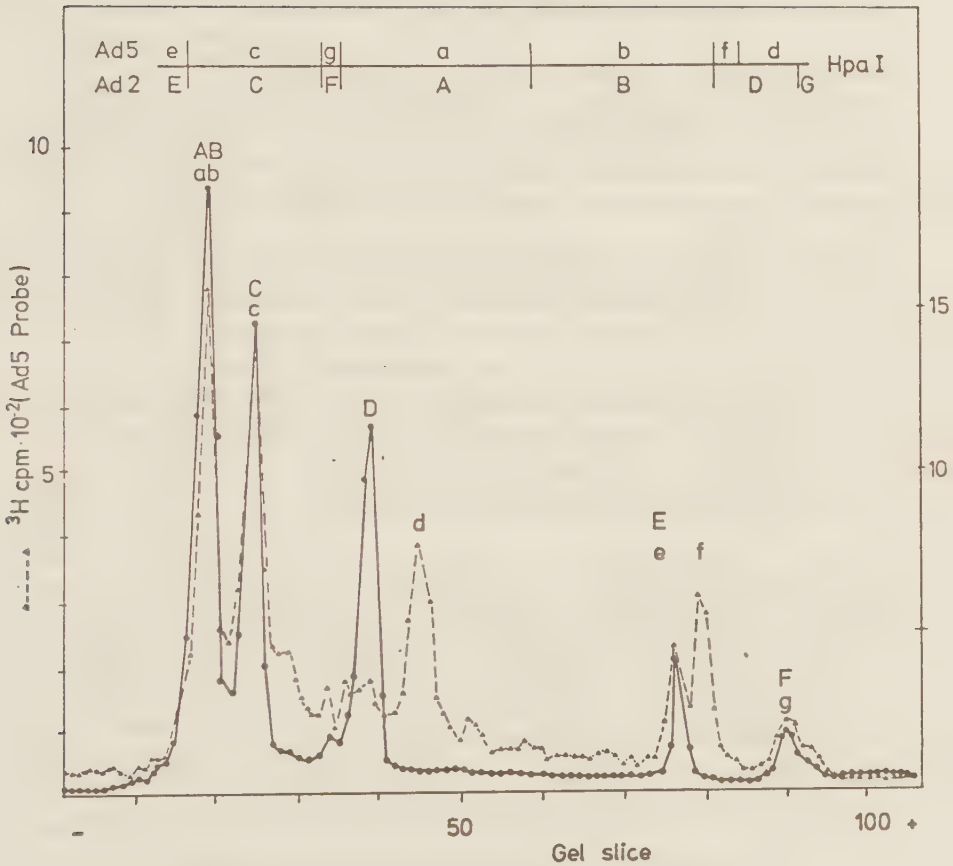


Abbildung 32:

Gelelektrophorese von IN VITRO synthetisierter Ad 5 DNA nach Fragmentierung mit dem Restriktionsenzym Hpa I.

DNA-Replikation wurde unter Standardbedingungen (3.14.3) mit Extrakten aus Ad 2-infizierten Zellen (3.14.2) und Ad 5-DNA-C als Matrize durchgeführt. Nach 50 minutiger Inkubation wurde DNA isoliert und in Gegenwart von ^{32}P -Ad 2-DNA mit Hpa I fragmentiert (3.6). Die Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.8.1). Die Anode befand sich rechts.

●—● ^{32}P -Ad 2-Marker-DNA ▲---▲ $^3\text{H cpm}$ der IN VITRO synthetisierten DNA.

4.2.6 Exogene DNA dient als Matrize für die DNA-Synthese IN VITRO

Um auszuschließen, daß endogene virale DNA bei der Herstellung der nuklearen Extrakte aus den Kernen eluiert wird und als Matrize für die DNA-Synthese dient, wurde das Produkt untersucht, das von einem Ad 2-infizierten Zellextrakt gebildet wird, wenn man statt Ad 2-DNA-Proteinkomplex den nahe verwandten Ad 5-DNA-Proteinkomplex als Substrat verwendet.

Die großen Homologien zwischen den beiden Serotypen, die beide der Gruppe C der menschlichen Adenoviren angehören (Green et al., 1979) sollten sie als Matrize für die DNA-Replikation IN VITRO austauschbar machen. Trotz der großen Homologien zeigen Ad 2 DNA und Ad 5 DNA bei der Fragmentierung mit einigen Restriktionsenzymen Unterschiede im Restriktionsmuster (Abb. 4). Die Methode der Restriktionsenzymverdauung der neusynthetisierten DNA wurde daher verwendet, die Frage nach der im IN VITRO-System verwendeten Matrize zu beantworten.

Führt man die DNA-Synthese IN VITRO durch, indem man Ad 5-DNA-Proteinkomplex als Substrat anbietet und inkubiert mit Extrakten aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen und schneidet die neusynthetisierte DNA in Gegenwart von ^{32}P -Ad 2-Marker-DNA mit dem Restriktionsenzym Hpa I, so findet man bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Fragmente ein für Ad 5-DNA typisches Fragmentierungsmuster (Abb. 32).

Dieses Ergebnis bestätigt, daß exogen zugesetzte DNA bei der DNA-Replikation IN VITRO als Matrize erkannt und abgelesen wird.

4.2.7 Verwendung von Mausadenovirus FL-DNA als Matrize für die DNA-Replikation IN VITRO

Neben den 31 serologisch verschiedenen menschlichen Adenoviren (Philipson et al., 1975, Wold et al., 1978) wurden aus einer Reihe von tierischen Arten, wie Hunden, Affen, Vögeln und Mäusen Adenoviren isoliert (Rowe und Hartley, 1962, Pereira, 1975).

Ein Vertreter der Mausadenoviren, Ad FL wurde in den letzten Jahren näher charakterisiert (Larsen und Nathans, 1977, Larsen et al., 1979, Temple et al., 1980). Ad FL-DNA hat ein Molekulargewicht von 20×10^6 Daltons und trägt wie Ad 2-DNA an beiden 5'-Enden ein terminales Protein. Die Länge der ebenfalls vorhandenen invertierten, terminalen

Repetition wurde durch Sequenzanalyse mit 93 Basen ermittelt, von denen die ersten 17 mit denen von Ad 2- und Ad 5-DNA identisch sind (Abb. 33) (Temple et al., 1980).

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Ad5	CATCATCAATAATATACCTTATTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTTGTGACGTGGCGCGGGGCTGGGAACGGGGCGGCTGACG									
Ad3	--ATCTATAATATACCTTATAGATGGAATGGTGCCAATGATGTAATGAGGTAATTTAAAAAGTGCGCGCTGTGTGGTGATTGGCTGCGGGGTTAACG									
Ad12	----TATATAATATACCTTATACTGGAGTAGTGCCAATATTAATAATGAGTGGGCGTAGTGTGTAATTTGATTGGGTGGAGGTGTGGCTTTGGCGTGCT									
SA7	---ATCAATAATATACCTTATTTGGGAACGGTGCCAATATGCTAATGAGGTGGGCGGAGTTTGGTGACGTATGCGGAAATGGGCGGAGTTAGGGGCGGG									
MAd	CATCATCAATAATATACAGTTAGCAAAAAATGGCGCCTTTGTTGGCTTTGTTCCAACGTGTTTTTGCCCCGAGTTGGGTTTCGTTTAGCCCCGGGTTTCAC									

Abbildung 33: Terminale Sequenzen der DNA von verschiedenen Adenoviren.
Übernommen von Antoine, 1979.

Andere Homologieregionen innerhalb der Repetition, die bei verschiedenen Adenoviren gefunden wurden (Tolun et al., 1979), scheinen bei Ad FL zu fehlen.

Dieses Ergebnis wird durch Reassoziationsexperimente erhärtet, die eine Sequenzhomologie von weniger als 10 % zwischen Ad FL-DNA und Ad 2-, Ad 7- und Ad 12-DNA ergaben. Dadurch wird auch der große Unterschied in den Restriktionsmustern von Ad FL-DNA (Larsen und Nathans, 1977) und Ad 2 DNA (Sambrook et al., 1975) (Abb. 4) und im G + C-Gehalt der Genome (AdFL : 44 %, Ad 2 : 57 %) verständlich.

Larsen und Nathans (1977) und Temple (pers. Mitteilung) konnten nach Infektion von menschlichen Zellen (HEK, HeLa, KB) mit Ad FL keinen cytopathischen Effekt beobachten. Welches Stadium eines produktiven Infektionszyklus in diesem Falle nicht vollzogen werden kann, ist unbekannt. In allen bisher sequenzierten Adenovirusgenomen sind die Basen 9 - 17 identisch (Tolun et al., 1979, Temple et al., 1980) (Abb. 33).

Falls für die Initiation der DNA-Replikation eine universelle Erkennungssequenz existiert, sollte sie in dieser Region an den molekularen Enden des viralen Genoms zu suchen sein. Da diese Sequenz auch bei Ad FL und Ad 2 identisch sind, sollte es möglich sein, Ad FL DNA unter Überspringung der frühen Schritte eines Infektionszyklus (Adsorption, Penetration, "uncoating", frühe Transkription und Translation) in dem beschriebenen IN VITRO-System zu replizieren.

Zur Untersuchung dieses Problems wurde Ad FL-DNA-Proteinkomplex mit Extrakten aus Ad 2-infizierten Zellen unter Standardbedingungen inkubiert. Die Einbaurate von ^3H -dTMP in säureunlösliches Material ist von der Standardreaktion mit Ad 2-DNA-Proteinkomplex als Matrize nicht signifikant unterscheidbar (Abb. 21). Im alkalischen Sucrosegradienten sedimentiert das ^3H -Produkt mit Ad 2-Marker-DNA (Abb. 34).

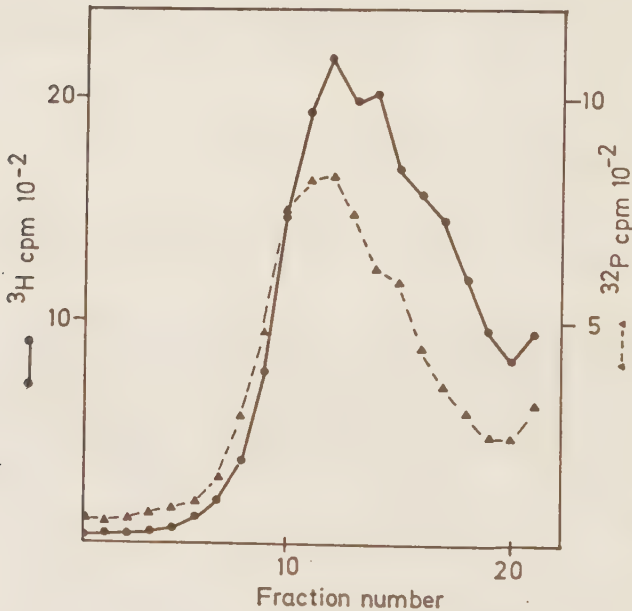


Abbildung 34: Analyse von IN VITRO synthetisierter Ad FL-DNA durch Sedimentation im alkalischen Sucrosegradienten. DNA-Replikation wurde unter Standardbedingungen (3.14.3) mit Extrakten aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen (3.14.2) und Ad FL-DNA-C als Matrize durchgeführt. Nach 50 minütiger Inkubation wurden 50 μl Probe auf einem alkalischen Sucrosegradienten lysiert und nach Zugabe von ^{32}P -Ad 2-Marker-DNA zentrifugiert (3.12.1).

Fragmentiert man die neusynthetisierte DNA in Gegenwart von ^{32}P -Ad 2-DNA, mit dem Restriktionsenzym Eco RI, erhält man nach der Auftrennung ein für Ad FL typisches Fragmentierungsmuster. (Abb. 35)

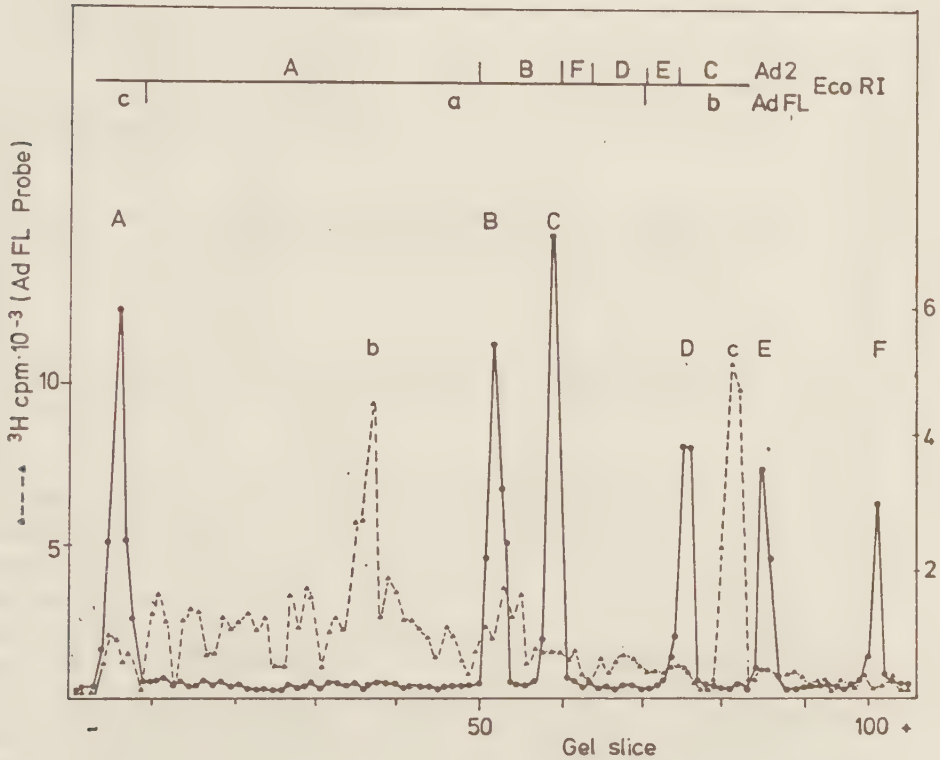


Abbildung 35: Gelelektrophorese von IN VITRO synthetisierter Ad FL-DNA nach Fragmentierung mit dem Restriktionsenzym Eco RI. Nach 50 minütiger Inkubation (Abb. 34) wurde DNA isoliert und in Gegenwart von ^{32}P -Ad 2-Marker-DNA mit Eco RI fragmentiert (3.6). Die Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt (3.8.1). Die Anode befand sich rechts. ●—● ^{32}P -Ad 2-Marker-DNA, ▲—▲ ^3H cpm der IN VITRO synthetisierten DNA.

Eluiert man die beiden Randfragmente B und C und trennt sie nach alkalischer Denaturierung gelelektrophoretisch auf, so findet man den Hauptanteil der Radioaktivität jeweils in dem schneller wandernden Fragmentstrang (Abb. 36, Tab. 8).

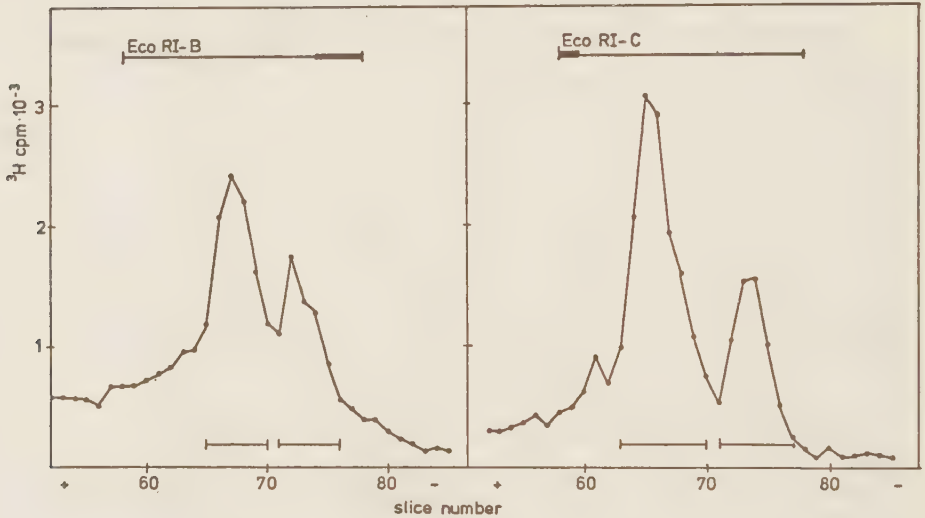


Abbildung 36:

Elektrophoretische Strangtrennungen von Restriktionsfragmenten IN VITRO synthetisierter Ad FL-DNA.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (Abb. 35) wurden die beiden Randfragmente Eco RI-B und Eco RI-C isoliert und nach Denaturierung mit 0.1 M NaOH elektrophoretisch in die beiden Komplementärstränge aufgetrennt (3.8.2). Die Striche unter den getrennten Fragmentsträngen bezeichnen jene Gelfractionen, die zur Bestimmung der Radioaktivitätsverhältnisse (Tab. 8) verwendet wurden. Die Anode befand sich links.

Die schneller wandernden Komplementärstränge sind sowohl bei dem Eco RI-B-Fragment als auch dem Eco RI-C-Fragment diejenigen, die das linke bzw. rechte 5'-Ende des viralen Genoms enthalten (M. Temple, persönliche Mitteilung). Man kann daher sagen, daß ein Ad DNA-Proteinkomplex, dessen Homologie sich auf identische 17 Basen am molekularen Ende beschränkt, von dem Ad 2-IN VITRO Replikationssystem erkannt und als Matrice verwendet wird.

Fragmente	Stränge	^3H cpm	Verh. *)	% Radioaktivität im schnellen Strang
eco RI-B	schnell	5158	2.8	73.9
	langsam	1818		
eco RI-C	schnell	10819	4.1	80.5
	langsam	2627		

*) Radioaktivitätsverhältnis des schnellen zum komplementären langsamen Fragmentsrang

Tabelle 8 Radioaktivitätsverteilung in gelelektrophoretisch getrennten Strängen von Restriktionsfragmenten IN VITRO synthetisierten Ad FL-DNA nach einem 50 minütigen Puls.

4.2.8 Bedeutung des terminalen Proteins für die DNA-Replikation IN VITRO

Verwendet man für die DNA-Replikation IN VITRO statt Ad 2-DNA-Proteinkomplex proteinfreie DNA als Matrize, so wird der Einbau von ^3H -dTMP in säureunlösliches Material um 80 % reduziert (Abb. 20). Im alkalischen Sucrosegradienten sedimentiert das Produkt als heterogenes niedermolekulares Material (Abb. 28) (Kaplan et al., 1979).

Setzt man DNA-Proteinkomplex als Matrize für die DNA-Replikation IN VITRO ein, und analysiert die neusynthetisierte DNA im Elektronenmikroskop, so findet man mit einer Häufigkeit von 5 % doppelsträngige DNA mit Einzelstrangverzweigungen, die nach dem Modell der "Displacement-synthese" Form I-Moleküle darstellen. Diese Form I-Moleküle konnten nicht gefunden werden, wenn man proteinfreie DNA als Matrize für die IN VITRO-DNA-Replikation verwendet (Challberg und Kelly, 1979a).

Diese Daten deuten darauf hin, daß das terminale Protein bei der DNA-Replikation IN VITRO eine Rolle spielt. Man kann deshalb postulieren, daß es sich bereits an der neusynthetisierten DNA befinden sollte.

Analysiert man Restriktionsfragmente von Ad 2-DNA-Proteinkomplex durch Gelelektrophorese in Gegenwart von nichtionischen Detergentien, so unterscheiden sich proteinenthaltende Fragmente von ihren proteinfreien Derivaten durch verminderte Mobilität. Durch Proteinase K-Verdauung wurde nachgewiesen, daß diese Mobilitätsverschiebung tatsächlich von der Gegenwart des Proteins abhängig ist (Fütterer, 1978). Dieser Test wurde zur Untersuchung von IN VITRO neusynthetisierter DNA angewendet: Nach einem zehnminutigen Puls wurde die IN VITRO synthetisierte DNA unter Bedingungen, bei denen das terminale Protein mit der DNA assoziiert bleibt (3.13.1), isoliert. Nach der Fragmentierung mit dem Restriktionsenzym HpaI in Gegenwart von ^{32}P -Ad 2-DNA-Proteinkomplex wurden die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 37 zeigt, daß die neusynthetisierte DNA mit der Marker-DNA, deren beide Randfragmente E und G ebenfalls das terminale Protein tragen, wandert. Es ist daher anzunehmen, daß neusynthetisierte DNA an beiden molekularen Enden ebenfalls ein Protein, wahrscheinlich gleichen Molekulargewichts enthält.

Verwendet man Kernextrakte aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen, die während der Virusinfektion mit ^{35}S Methionin markiert worden waren und fragmentiert nach der IN VITRO-DNA-Synthese den neusynthetisierten DNA-Proteinkomplex mit dem Restriktionsenzym Hpa I, so findet man nach der gelelektrophoretischen Auftrennung den Hauptanteil der ^{35}S -Markierung an den Stellen, wo sich auch die beiden Randfragmente der viralen DNA, E und G, befinden (J.Fütterer, persönliche Mitteilung).

Man kann daher postulieren, daß das terminale Protein in den Ad 2-infizierten HeLa-Zellen synthetisiert wird. Bei der Salzextraktion wird es aus den Kernen eluiert und bei der IN VITRO DNA-Replikation an die molekularen Enden des viralen Genoms assoziiert.

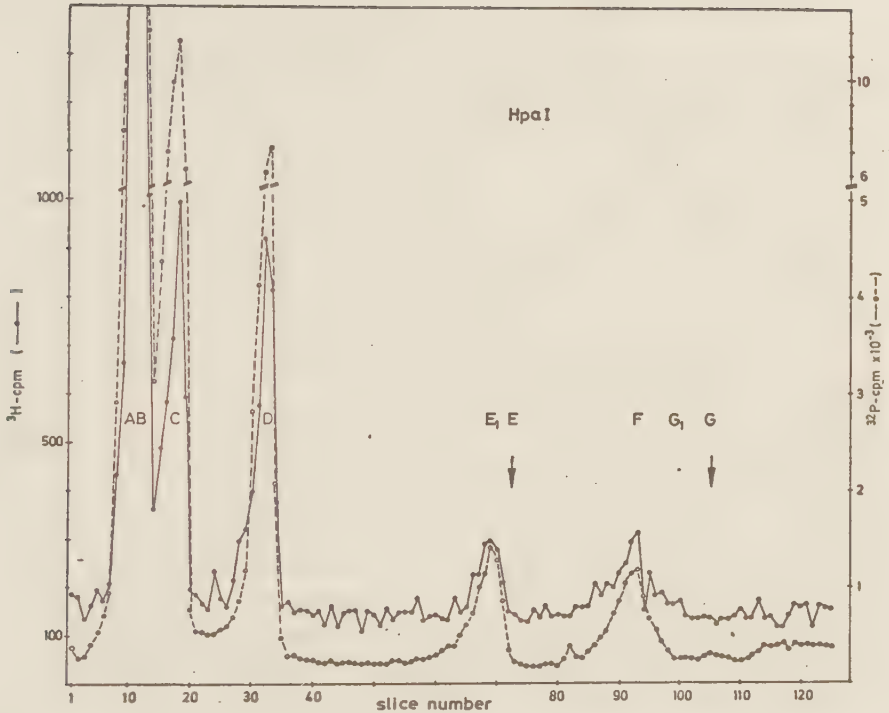


Abbildung 37:

Fragmentierungsmuster von IN VITRO synthetisierter DNA, die ohne Verwenden von proteolytischen Enzymen isoliert wurde.

IN VITRO-DNA Replikation wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Nach 10 minutiger Inkubation wurde ein DNA-Proteinkomplex durch Zentrifugation im CsCl -Dichtegradienten (4 M GuHCl , 0.01 % Sarkosyl) isoliert (3.13.1) und in Gegenwart von ^{32}P Ad 2-DNA-Proteinkomplex mit Hpa I fragmentiert (3.6). Die Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.8.1). Die Anode befand sich rechts.

●—● ^3H cpm der IN VITRO synthetisierten DNA, o---o ^{32}P -Ad 2 DNA-Proteinkomplex

4.2.9 Stimulierung der DNA-Replikation mit Diadenosin 5', 5'''-p¹, p⁴ tetraphosphat (Ap₄A)

Die unterschiedlichen Kernsysteme, die zur Untersuchung der DNA-Synthese verwendet werden (Winnacker, 1978, Flint, 1979), haben den Vorteil, daß sie keine signifikante Barriere für exogen zugesetzte Nukleotide oder Drogen darstellen. Ein Nachteil des Kernsystems liegt jedoch darin, daß die DNA-Syntheserate geringer ist als IN VIVO, und daß die DNA-Synthese abhängig von dem verwendeten System, nach einiger Zeit aufhört. Die Ursache hierfür ist sicher mit darin zu suchen, daß isolierte Zellkerne nicht in der Lage sind, DNA-Replikation zu initiieren (Winnacker, 1978). Durch die drastische Zerstörung der Zellstruktur bei der Isolierung der Kerne werden offensichtlich Faktoren eliminiert, die für die Initiation der DNA-Replikation notwendig sind.

Allgemein wird angenommen, daß die Initiation der DNA-Synthese von cytoplasmatischen Komponenten kontrolliert wird (Graham et al., 1966, Johnson and Harris, 1969), wobei diese Faktoren als positive Regulationssignale wirken (Rao und Johnson, 1970). Sie wurden entweder als hitzestabile Komponenten mit niedrigem Molekulargewicht (Thompson und McCarthy, 1968, Shimada und Gerayama, 1972) oder als Proteine mit hohem Molekulargewicht (De Pamphilis und Berg, 1975, Benbow und Ford, 1975, Jazwinski et al., 1976, Jazwinski und Edelman, 1976, Murakami-Murofushi und Mano, 1977) beschrieben. Grummt (1978) konnte zeigen, daß das von Rapoport und Zamecnik (1976) in Säugerzellen entdeckte Purinnukleotid Diadenosine 5', 5'''-p¹, p⁴-tetraphosphat (Ap₄A) DNA-Synthese in ruhenden BHK-Zellen stimuliert, wobei es spezifisch an die 57 K-Untereinheit der DNA-Polymerase α aus Kälberthymus bindet (Grummt et al., 1979). Da bekannt ist, daß an der Replikation von Ad DNA die zellulären DNA-Polymerasen α und γ beteiligt sind (Arens et al., 1977, Brison et al., 1977, Frenkel, 1978, Abboud und Horwitz, 1979), bestand die Möglichkeit, daß virale DNA-Replikation durch Ap₄A stimuliert werden könnte.

Zur Prüfung dieser Frage wurden 18 - 20 hpi Zellkerne aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen präpariert (3.15.1) und unter für DNA-Synthese optimalen Bedingungen (3.15.2) ohne oder mit 10⁻⁴M Ap₄A inkubiert. Abb. 38 zeigt, daß der Zusatz von Ap₄A eine dreifache Stimulierung der DNA-Synthese bewirkt. Während bei der DNA-Replikation, die in Abwesenheit von Ap₄A durchgeführt worden war, die Replikation nach 30 Minuten annähernd zum

Erliegen kommt, ist die DNA-Synthese in Gegenwart von Ap_4A 90 Minuten linear. Durch Sucrosegradientenzentrifugation und Fragmentierung mit dem Restriktionsenzym *Hpa* I wurde nachgewiesen, daß das bei der Inkubation in Gegenwart von Ap_4A entstehende Produkt virale DNA ist.

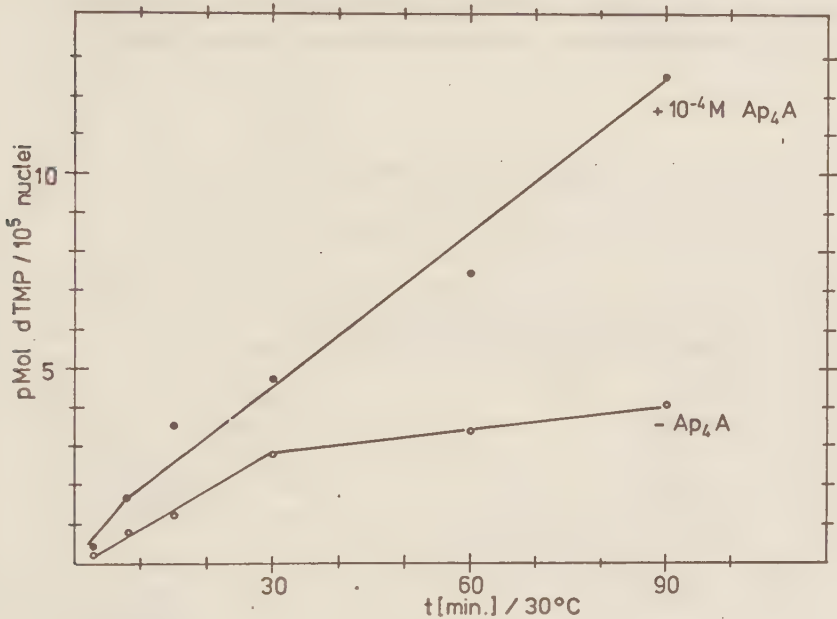


Abbildung 38:
Stimulierung der Ad 2 DNA-Replikation in isolierten Zellkernen durch Ap_4A .
Zellkerne wurden 18 hpi aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen isoliert (3.15.1). DNA-Replikation wurde unter Standardbedingungen (3.15.2) ohne ($\circ$ — $\circ$) oder mit 10^{-4} M Ap_4A (Na-Salz) ($\bullet$ — $\bullet$) gemessen. Der Einbau von Nukleotiden in DNA wurde als TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.

Für die Rolle des Ap_4A bei der Initiation der Ad-DNA-Replikation gibt es mindestens zwei Möglichkeiten. Zum einen könnte Ap_4A den notwendigen 3'-OH-"primer" in Form eines Adenosinrestes, der unter ATP-Abspaltung an das terminale Protein gebunden wird, bilden. Zum anderen wäre es denkbar, daß das terminale Protein durch Ap_4A adenyliert und damit aktiviert wird, ein Desoxyribonukleotid kovalent zu binden (Abb. 39) (Reiter et al., 1979).

Wenn Ap_4A die Funktion eines "primers" bei der Initiation der Ad DNA-Replikation hat, könnte es möglich sein, daß es an neusynthetisierter DNA nachzuweisen ist. Zur Untersuchung dieser Frage wurden Zellkerne aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen in Gegenwart von $^3\text{H}\text{-Ap}_4\text{A}$ unter Standardbedingungen 50 Minuten inkubiert und nach Lyse der Zellkerne auf einem 10 - 30 %-igen Sucrosegradienten, der 1 M GuHCl enthielt, sedimentiert.

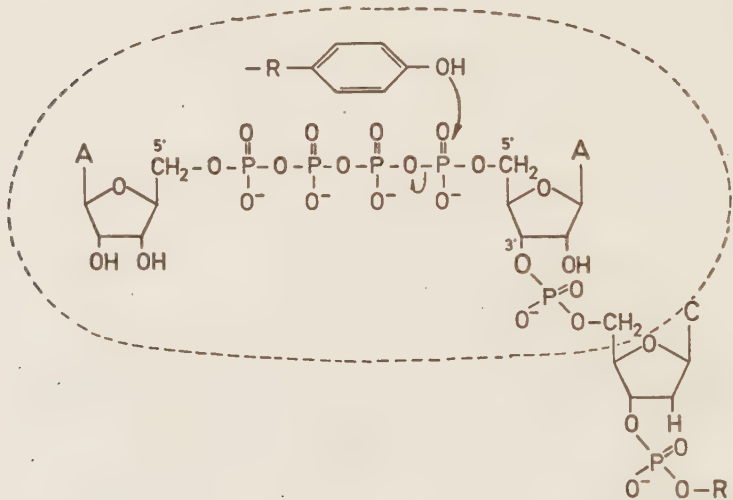


Abbildung 39: Modell zur Initiation der Adenovirus DNA-Replikation. Das Modell ist im Text erklärt.

Wie Abb. 40 zeigt, sedimentieren 55 % der säureunlöslichen Radioaktivität mit der ^{32}P -Ad 2-Marker-DNA, während 45 % der Radioaktivität langsamer als der Marker sedimentieren.

In einen Testansatz werden 3×10^6 Kerne aus Ad 2-infizierten Zellen eingesetzt. Geht man davon aus, daß 20 Stunden nach Infektion 200.000 DNA-Moleküle pro Zelle synthetisiert sind (Fanning und Doerfler, 1977), so werden in einem Testansatz 1 pMol DNA eingesetzt. Nach 50 minutiger

Inkubation sedimentieren 1.3 pMol ^3H -Ap $_4$ A mit viraler DNA, was einem Verhältnis Ap $_4$ A : DNA = 1.3 entspricht. Ein Verhältnis in dieser Größenordnung würde man erwarten, wenn pro vorhandenem ds DNA-Molekül die Synthese von 1 Tochterstrangmolekül, für dessen Initiation Ap $_4$ A als Primer dient, initiiert wird. Ob diese Co-Sedimentation tatsächlich auf einer Wechselwirkung zwischen DNA und Ap $_4$ A beruht, wurde aber bisher nicht weiter untersucht.

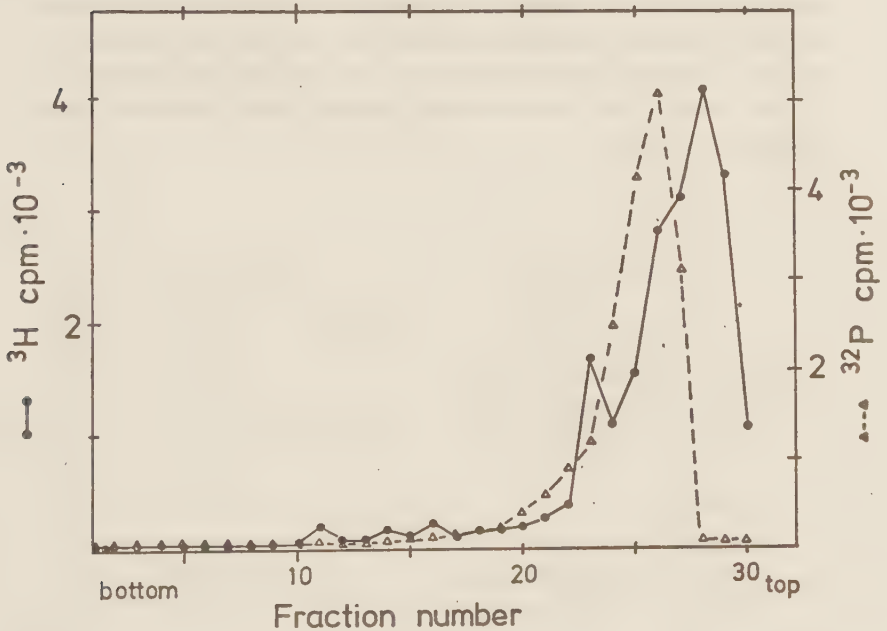


Abbildung 40:

Analyse von neusynthetisierter DNA aus isolierten Zellkernen durch Sedimentation im alkalischen Sucrosegradienten.

Zellkerne wurden aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen isoliert (3.15.1) und die DNA-Replikation in einem Standardreaktionsansatz in Gegenwart von $8 \times 10^{-4}\text{M}$ ^3H -Ap $_4$ A (27.9 Ci/mMol) durchgeführt (3.15.2). Nach 50 minutiger Inkubation wurden die Zellkerne direkt auf einem 10 - 30 prozentigen Sucrosegradienten (1 M GuHCl) lysiert und 3 Stunden zentrifugiert (3.15.2)

—●— ^3H -Probe (8000 cpm = 1 pMol ^3H -Ap $_4$ A) ▲---▲ = ^{32}P -Ad 2-Marker-DNA

Kaum ausgeprägt zeigt sich der Effekt von Ap₄A in dem löslichen IN VITRO-System.

Von den drei getesteten Salzen des Ap₄A konnte nur mit dem Natriumsalz eine 1.5 fache Stimulierung der DNA-Synthese beobachtet werden (Abb. 42). Weder das Ammoniumsalz noch das Lithiumsalz des Ap₄A wirkten auf die DNA-Replikation IN VITRO stimulierend (Tab. 9).

Daß bei der DNA-Synthese IN VITRO keine Stimulierung durch Ap₄A beobachtet wird, könnte vielleicht daran liegen, daß Ap₄A zur Entfaltung seiner Wirksamkeit auf intakte Membranstrukturen, die in einem IN VITRO-System nicht mehr vorhanden sind, angewiesen ist. Es ist auch nicht auszuschließen, daß Ap₄A in einem IN VITRO-System abgebaut wird. Versuche, die zur Klärung dieser Fragen beitragen könnten, sind bisher noch nicht durchgeführt worden.

Testbedingungen	Aktivität (%)
Standard	100
+ 7×10^{-5} M Ap ₄ A (NH ₄ -Salz)	96
+ 9×10^{-5} M Ap ₄ A (Li-Salz)	101
+ 7×10^{-5} M Ap ₄ A (Na-Salz)	147
- ATP	8
+ 8×10^{-5} M ADP	106
+ 2×10^{-5} M Methylen-bis-AMP	106
+ 3×10^{-5} M Methylen-bis-ADP	1
+ 1×10^{-3} M Cl ₂ Pt (Gly Gly OEt) ₂	13

Tabelle 9: Effekt von Hemmstoffen und Stimulatoren auf die Ad 2 DNA-Replikation IN VITRO.

4.2.10 Hemmung der DNA-Replikation IN VITRO

4.2.10.1 Hemmung durch Methylen-bis Adenosindiphosphat

Die Bindung von Ap₄A an die 57 K-Untereinheit der DNA-Polymerase α aus Kälberthymus ist sehr spezifisch. Sie kann erst durch Zugabe von 2000-fachem Überschuß von Strukturanalogen (Ap₂A, Ap₃A, Ap₅A, Ap₆A, Ap₄T) um maximal 60 % gehemmt werden (Grummt et al., 1979).

Ein potentiellies Struktur analog, Methylen-bis-ADP hemmt die DNA-Replikation IN VITRO jedoch sehr effizient. 4 μ M Methylen-bis-ADP reduzieren die DNA-Replikation IN VITRO um 50 % (Abb. 41) Methylen-bis-AMP und ADP haben keinen Einfluß auf die IN VITRO-DNA-Synthese (Abb. 42).

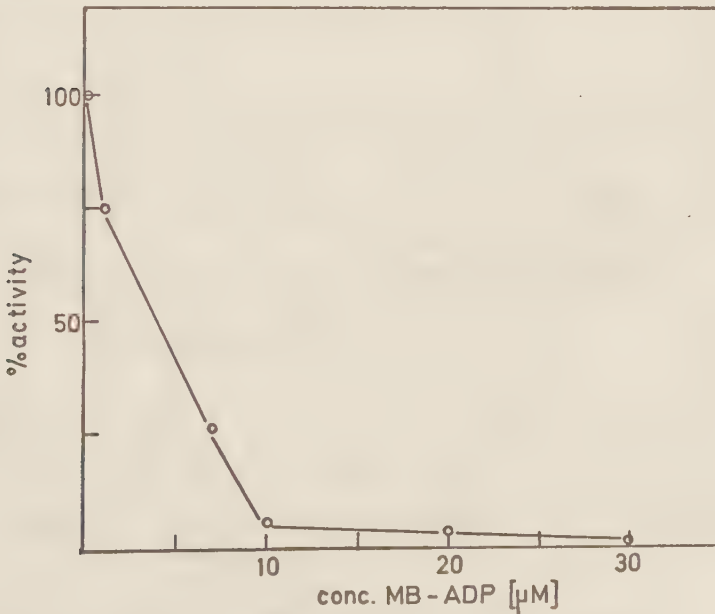


Abbildung 41:

Dosis-Wirkungskurve der Hemmung durch Methylen-bis-ADP. IN VITRO-DNA-Replikation wurde unter Standardbedingungen (3.14.3) und in Gegenwart der angegebenen Mengen an MB-ADP durchgeführt. Nach 45 minütiger Inkubation bei 30°C wurde der Einbau von Nukleotiden in DNA als TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt. 100 % = Einbau von 22 pMol dTMP (6614 cpm).

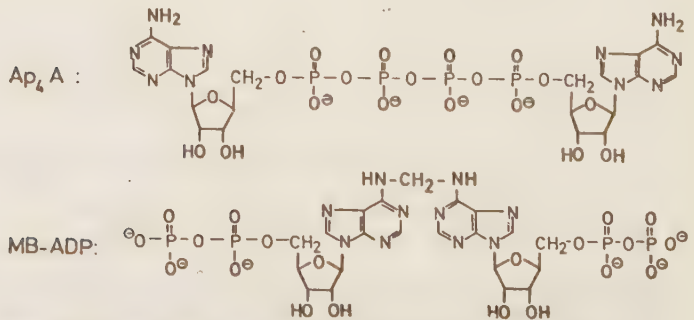
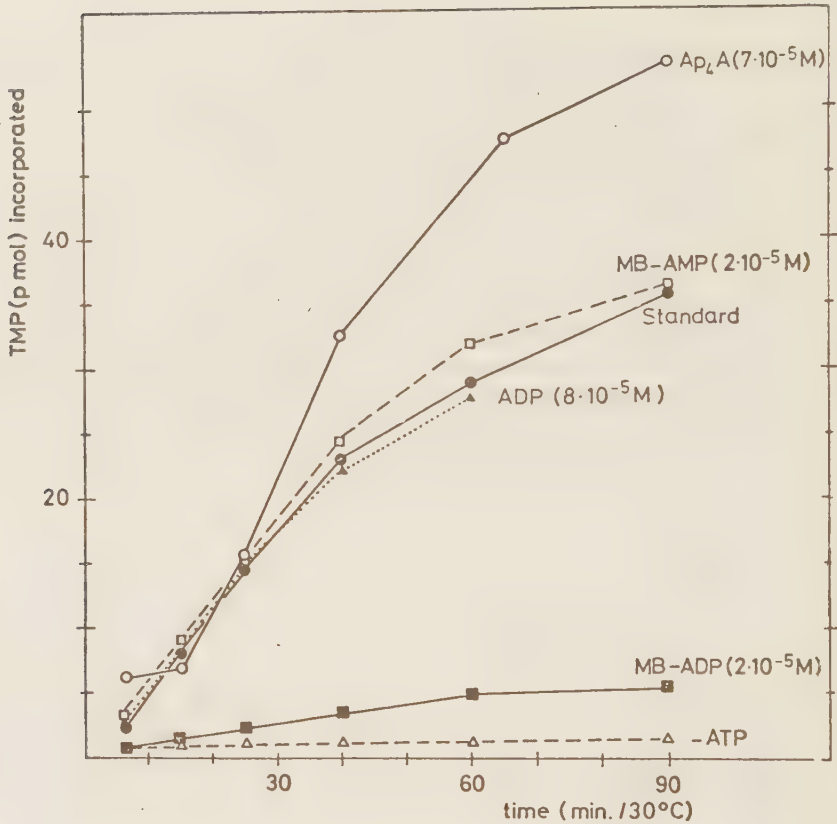


Abbildung 42: Hemmung der DNA-Replikation IN VITRO durch Metnyrien-bis-ADP. Die Kinetiken der DNA-Replikation wurden unter Standardbedingungen (●) oder in Gegenwart von 7×10^{-5} M Ap₄A (Na-Salz) (○), 2×10^{-5} M MB-AMP (□), 8×10^{-5} M ADP (△), 2×10^{-5} M MB-ADP (■) oder ohne ATP gemessen (▲) (3.14.3).

Der Hemmeffekt von Methylen-bis-ADP kann durch Ap₄A, auch wenn es in 10-fachem Überschuß zugegeben wird, nicht aufgehoben werden (Tab. 10), so daß die beiden Purinnukleotide Ap₄A und Methylen-bis-ADP wahrscheinlich keine gemeinsamen Bindungsstellen an der DNA-Polymerase α besitzen. Für die Versuche zur Aufhebung des Hemmeffektes von Methylen-bis-ADP wurde allerdings das Ammoniumsalz von Ap₄A verwendet. Dieses Salz hatte unter IN VITRO-Bedingungen keine Stimulierung der DNA-Replikation bewirkt (Tab. 9). Es bleibt deshalb zu prüfen, ob die Hemmwirkung des Methylen-bis-ADP irreversibel ist, wenn man für die Kompetitionsversuche das Natriumsalz von Ap₄A einsetzt. Ebenfalls nicht untersucht ist bisher die Hemmwirkung von Methylen-bis-ADP auf die virale DNA-Synthese in isolierten Zellkernen.

Ap ₄ A (NH ₄ -Salz) conc. (μ M)	Methylen-bis-ADP conc. (μ M)	Aktivität (%)
0	0	100
30	0	112
70	0	92
100	0	95
0	10	4
30	10	5
70	10	4
100	10	4

Tabelle 10: Hemmeffekt von Methylen-bis-ADP auf die DNA-Replikation IN VITRO wird durch Ap₄A nicht aufgehoben.

4.2.10.2 Hemmung der DNA-Replikation IN VITRO durch den cis-Dichloro-dipeptidesterplatin(II)-Komplex cis-Cl₂ Pt (Gly Gly OEt)₂

Platinkomplexe des Typs cis-(PtA₂X₂) (A: Aminligand, z.B. NH₃; X: anionischer Ligand, z.B. Cl⁻) sind seit über 100 Jahren bekannt (Peyrone, 1845) und werden wegen ihrer tumorhemmenden Wirkung seit einigen Jahren eingehend pharmakologisch und klinisch geprüft (Rosenberg, 1973). Die Wechselwirkungen zwischen den Platinverbindungen und biologischen Molekülen wurden von mehreren Forschungsgruppen untersucht, die gefunden haben, daß Platin an Purin- und Pyrimidinbasen binden kann, wobei es bevorzugt an Guanin (Robins, 1973) und Cytosin bindet (Stone et al., 1974).

Unter zahlreichen möglichen Reaktionen wird eine Verknüpfung der komplementären DNA-Stränge ("interstrand-cross-linking") durch cis-(PtA₂)-Reste als die eigentliche Ursache der antineoplastischen Wirkung diskutiert (Roberts und Pascoe, 1972, Rosenberg, 1973), wobei die Bindung des Platins an das N⁷-Atom in Guanosin-Platin (II)-Komplexen nachgewiesen wurde (Gellert und Bau, 1975, Tobias et al., 1975).

cis-Cl₂ Pt (Gly Gly O Et)₂ wurde von Beck und Mitarbeitern synthetisiert, und die tumorhemmende Wirkung in verschiedenen Carcinosarkomzellkulturen getestet. Es wurde nachgewiesen, daß durch diesen Platinkomplex bevorzugt DNA-Synthese gehemmt wird, wobei die Hemmung ab einer InhibitorKonzentration von 10⁻⁴ M nahezu vollständig ist (Beck et al., 1976). Es war nun interessant zu testen, inwieweit ein IN VITRO-Replikationssystem für die Untersuchung solcher tumorhemmender Stoffe geeignet ist. Zu diesem Zwecke wurde eine IN VITRO-DNA-Replikationsreaktion unter Standardbedingungen und in Gegenwart von 7 x 10⁻⁴M cis-Cl₂Pt(GlyGlyOEt)₂ durchgeführt. Wie Abb. 43 zeigt, wird die DNA-Synthese durch den Inhibitor um 80 % gehemmt.

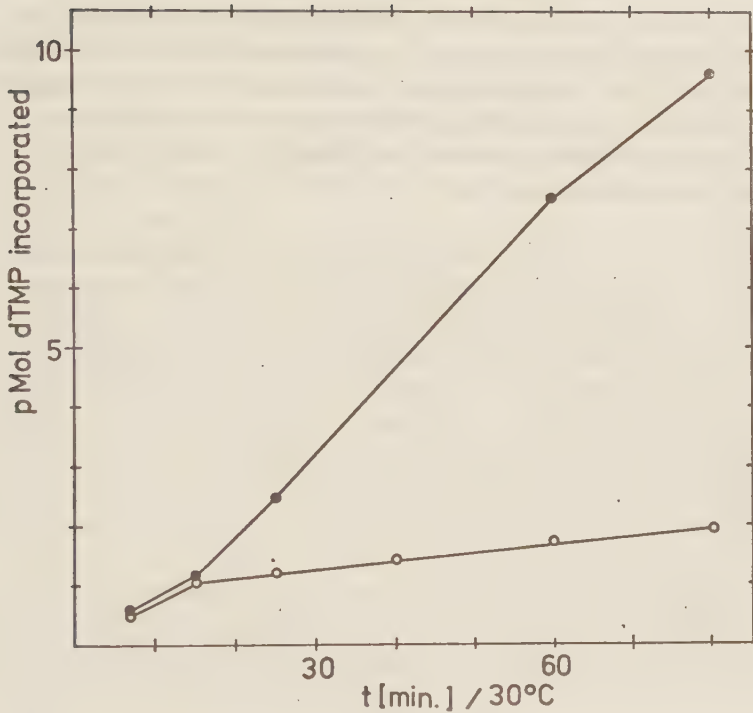


Abbildung 43: Hemmung der IN VITRO-DNA-Synthese durch cis-Cl₂ Pt (Gly Gly O Et)₂
Kinetiken der DNA-Replikation wurden unter Standardbedingungen (●—●) oder in Gegenwart von 7 x 10⁻⁴ M cis-Cl₂ Pt (Gly Gly O Et)₂ (○—○) gemessen (3.14.3).

Mißt man die Hemmung der IN VITRO-DNA-Replikation in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration, so findet man, daß eine 50 %-ige Hemmung durch eine cis-Cl₂ Pt (Gly Gly O Et)₂-Konzentration von 2 x 10⁻⁴M erreicht wird (Abb. 44). Unter Standardbedingungen werden in den Reaktionsansatz 8 µg/ml DNA eingesetzt, was einer Konzentration von 26 nMol/ml Nukleotiden entspricht.

Gleichzeitig werden 2.2 $\mu\text{Mol/ml}$ Nukleosidtriphosphate (2 μMol ATP + 0.2 μMol dNTP) zugegeben, was einem 85-fachen Überschuß an Nukleotiden gegenüber Polynukleotiden entspricht. Da Nukleosidtriphosphate ebenfalls in der Lage sind, Platinverbindungen zu binden (Robins, 1973), kann man annehmen, daß der Hauptanteil des Platinkomplexes an die Nukleosidtriphosphate gebunden wird und für die Hemmung der DNA-Replikation höhere Konzentrationen vortäuscht.

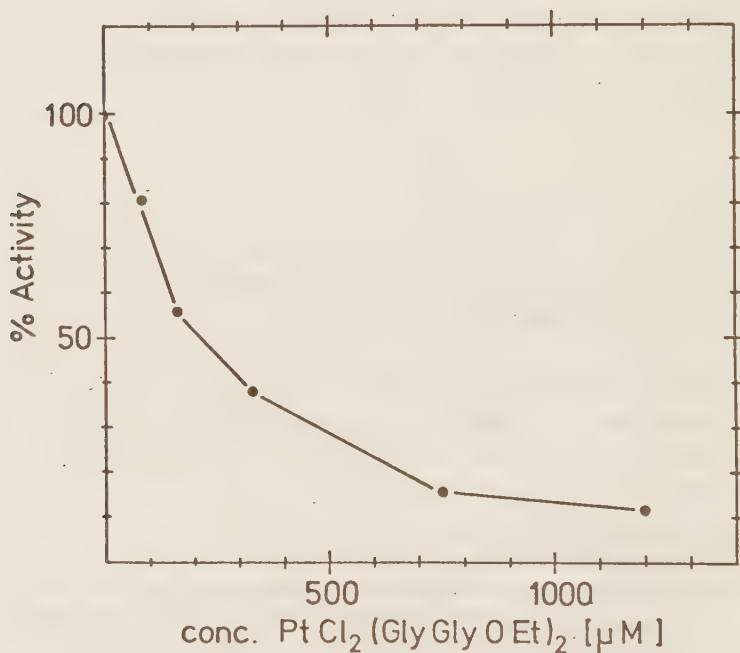


Abbildung 44:

Dosis-Wirkungskurve der Hemmung durch cis-Cl₂ Pt (Gly Gly O Et)₂ IN VITRO-DNA-Synthese wurde unter Standardbedingungen (3.14.3) oder in Gegenwart der angegebenen Mengen an cis-Cl₂ Pt (Gly Gly O Et)₂ durchgeführt. Nach 45 minutiger Inkubation bei 30°C wurde der Einbau von Nukleotiden in DNA als TCA-fällbare Radioaktivität gemessen. 100 % = Einbau von 25 pMol dTMP (7492 cpm).

5. DISKUSSION

Am Ausgangspunkt der Arbeit stand eine Kontroverse um die Lage von Ursprungsorten der Adenovirus DNA-Replikation. In einem IN VITRO-System aus isolierten Zellkernen hatten Sussenbach und Mitarbeiter (Sussenbach et al., 1973, Ellens et al., 1974) gefunden, daß die DNA-Replikation bei Adenoviren über "displacement"-Synthese verläuft und am rechten molekularen Ende der DNA beginnt.

Spätere Untersuchungen (Lavelle et al., 1975, Tolun und Petterson, 1975, Sussenbach et al., 1976, Horwitz, 1976, Weingärtner et al., 1976) hatten dann gezeigt, daß sich End- und Anfangspunkte der DNA-Replikation an beiden molekularen Enden der DNA befinden müssen. Während also das Modell der "displacement"-Synthese akzeptiert wurde, war die Frage nach den Ursprungsorten kontrovers. Insbesondere war an den Sussenbach'schen Versuchen kritisiert worden, daß hier die Synchronisation der DNA-Synthese mit Hydroxyharnstoff erfolgt war. So effizient dieser Prozeß erschien, so unnatürlich war er auf der anderen Seite.

In 2 Versuchsansätzen wollte ich die Frage nach den Replikationsursprungsorten zu lösen versuchen; durch Synchronisation der DNA-Synthese IN VIVO mit einer geeigneten ts-Mutante in der DNA-Replikation und durch die Entwicklung eines IN VITRO-Systems.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher eine von Kathmann et al. (1976) isolierte Mutante, H2 ts214, näher charakterisiert, um eventuell Aussagen über die Replikationsursprungsorte machen zu können. Man kann solche Mutanten auf zweierlei Arten charakterisieren. Entweder hält man sie nach der Infektion immer bei restriktiven Bedingungen, um ihren DNA-negativen Charakter nachzuweisen oder man macht Temperatur-"shift"-Experimente etwa derart, daß zu einem Zeitpunkt maximaler DNA-Synthese bei permissiver Temperatur auf die nicht-permissive Temperatur angehoben wird. Dann kann prinzipiell zweierlei geschehen: Die DNA-Synthese stoppt oder sie läuft langsam aus. Den ersten Fall könnte man als einen Defekt in der Elongationsreaktion charakterisieren, den zweiten als einen Block in der Initiationsreaktion, der natürlich noch ein Auslaufen bereits initiiertter DNA-Synthese gestattet. In der Praxis müssen solche Schlußfolgerungen noch durch zusätzliche Beobachtungen erhärtet werden, wie das durch Zentrifugation unter denaturierenden Bedingungen gut

geschehen kann. Ein Elongationsblock, der das System mitten in der Synthese "einfriert", läßt eine heterogene Verteilung neusynthetisierter DNA erwarten, ein Initiationsblock nur intakte DNA. Mit Hilfe dieser Methode habe ich die Mutante untersucht.

Durch Sedimentationsanalysen im alkalischen Sucrosegradienten konnte bestätigt werden, daß die Mutante H2 ts214 unter restriktiven Bedingungen einen Defekt in der viralen DNA-Replikation hat. Bei einer nicht-permissiven Temperatur von 39.5°C ist die DNA-Synthese im Vergleich zu permissiven Bedingungen in H2 ts214-infizierten Zellen um 80 bis 85 % reduziert (Abb. 7). Das thermolabile Protein kann also unter restriktiven Bedingungen nur noch sehr beschränkt Wildtypfunktionen erfüllen. Dennoch ist klar, daß die Mutante teilweise "leaky" ist. Weniger "leaky" scheint eine andere Mutante, H5 ts125, zu sein, die für das virusspezifische DNA-bindende Protein kartiert und einer anderen Komplementationsgruppe angehört. Es ist beschrieben, daß die virale DNA-Synthese in H5 ts125-infizierten Zellen unter ähnlich restriktiven Bedingungen um mehr als 98 % inhibiert ist (Ensinger und Ginsberg, 1972, Wilkie et al., 1973, van der Vliet et al., 1975, Sussenbach und Kuijk, 1978).

Zur selben Komplementationsgruppe wie H5 ts125 gehört die aus der Gruppe A der menschlichen Adenoviren isolierte DNA-negative Mutante H12 ts A275 (Tab. 2) (Shiroki und Shimojo, 1974, Ginsberg et al., 1974, Winnacker, 1978). Über den Unterschied in der DNA-Syntheserate unter restriktiven und permissiven Bedingungen ist bei dieser Mutante nichts beschrieben. Da jedoch 5 Minuten nach einer Temperaturerniedrigung von 40° auf 34°C und gleichzeitiger ³H-Thymidinpulsmarkierung 30 % der radioaktiv markierten DNA-Moleküle als intakte, doppelsträngige DNA vorliegen (Ariga und Shimojo, 1977), ist anzunehmen, daß auch bei dieser Mutante das thermolabile Protein unter restriktiven Bedingungen noch teilweise Wildtypfunktionen erfüllen kann. Man erkennt hier deutlich die Problematik des Arbeitens mit ts-Mutanten.

Bei einer Temperaturerhöhung von 32° auf 39.5°C wird die virale DNA-Synthese in H2 ts214-infizierten Zellen für 30 Minuten stimuliert und anschließend gehemmt, bis sie nach etwa 3 Stunden annähernd zum Stillstand gekommen ist (Abb. 8).

Ein ähnliches Verhalten ist für die DNA-negative Mutante H31 ts A13 beschrieben (Suzuki und Shimojo, 1971, 1973), die derselben Komplementationsgruppe wie H 5 ts125 und H12 ts A275 angehört (Tab. 2). Nach Temperaturerhöhung auf restriktive Bedingungen ist die DNA-Synthese in H31 ts A13-infizierten Zellen für 30 Minuten erhöht und nimmt anschließend ab. Nach 2 Stunden ist die DNA-Synthese um 80 %, nach 4 Stunden um mehr als 90 % gehemmt.

In H5 ts125-infizierten Zellen wird die DNA-Replikation nach Temperaturerhöhung für 15 Minuten leicht stimuliert und nimmt dann ab, bis nach 1 Stunde keine signifikante DNA-Replikation mehr nachzuweisen ist (van der Vliet und Sussenbach, 1975).

Nach Temperaturerhöhung auf restriktive Bedingungen verläuft die virale DNA-Synthese in H12 ts A275-infizierten Zellen für 1 bis 2 Stunden mit konstanter Geschwindigkeit und nimmt dann ab. 3 Stunden nach Temperaturerhöhung kann keine oder wenig virale DNA-Synthese nachgewiesen werden (Shiroki und Shimojo, 1974). In Experimenten, bei denen fertige DNA mittels Hydroxylapatitchromatographie von replizierender DNA getrennt wurde, wurde gezeigt, daß bei dieser Mutante die virale DNA-Replikation nach einem 2 Stunden "chase" beendet ist (Ariga und Shimojo, 1977).

Im Gegensatz dazu wird nach Temperaturerhöhung die virale DNA-Synthese in H5 ts36-infizierten Zellen für mindestens 4 Stunden beschleunigt und nimmt erst dann langsam ab, bis sie nach frühestens 8 Stunden aufhört (Ginsberg et al., 1974, van der Vliet und Sussenbach, 1975, Carter und Ginsberg, 1976). Die verzögerte Hemmung der DNA-Synthese nach Temperaturerhöhung könnte durch eine langsame Inaktivierung des thermolabilen Proteins erklärt werden. Obwohl das Genprodukt von H5 ts36 nicht bekannt ist, gibt es Hinweise, daß es in katalytischen Mengen bei der DNA-Replikation gebraucht wird (Williams et al., 1974, Galos et al., 1979). Wenn also das thermolabile Protein in geringen Mengen für die Initiation der DNA-Synthese benötigt und nach Temperaturerhöhung langsam inaktiviert wird, sollte das zum Zeitpunkt der Temperaturerhöhung intakt vorliegende Protein ausreichen, um die DNA-Synthese über mehrere Stunden zu katalysieren.

Bei einer Inkubationstemperatur von 32°C beträgt die Dauer einer Replikationsrunde 60 bis 90 Minuten (Abb. 13) (Ariga und Shimojo, 1977, Sus-

senbach und Kuijk, 1978, Bodnar und Pearson, 1980). Eine Initiationsmutante, deren thermolabiles Protein relativ schnell inaktiviert wird, sollte daher 60 bis 90 Minuten nach Temperaturerhöhung nicht mehr in der Lage sein, virale DNA-Synthese zu katalysieren. Die Mutanten H5 ts125, H12 ts A275 und H31 ts A13 liegen in einer Komplementationsgruppe (Tab. 2) (Winnacker, 1978). Unter restriktiven Bedingungen synthetisieren sie ein thermolabiles DNA-bindendes Protein (van der Vliet und Levine, 1973, van der Vliet et al., 1975). Die Zeit, die zur Inaktivierung des Proteins benötigt wird, beträgt für H5 ts125 etwa 1 Stunde (van der Vliet und Sussenbach, 1975) und für H12 ts A 275 und H31 ts A13 etwa 2 Stunden (Suzuki und Shimojo, 1971, Ariga und Shimojo, 1977). Diese Befunde erwartet man für eine Initiationsmutante, bei der die benötigte Zeit zur Inaktivierung des thermolabilen Proteins kurz ist. Es ist daher anzunehmen, daß der zum Zeitpunkt der Temperaturerhöhung vorhandene Pool an funktionsfähigem DNA-bindenden Protein während einer Replikationsrunde verbraucht wird.

Die Zeit zur Inaktivierung des thermolabilen Proteins, das von H2 ts214 synthetisiert wird, beträgt etwa 3 Stunden, was 2 bis 3 Replikationsrunden entspricht. Man könnte sich vorstellen, daß zum Zeitpunkt der Temperaturerhöhung mehr intakte Proteinmoleküle vorliegen als für 1 Replikationsrunde gebraucht werden und/oder diese langsam inaktiviert werden, was zu einer Verzögerung der Hemmung führt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß bei H2 ts214 wie bei den anderen eben beschriebenen Mutanten eine zum Zeitpunkt der Temperaturerhöhung begonnene Replikationsrunde beendet, aber nicht mehr neu initiiert wird. Alle genannten Mutanten, wie immer sie die DNA-Synthese abstellen, scheinen jedoch der anfangs postulierten Eigenschaft einer Initiationsmutante zu entsprechen.

Durch "Puls-chase"-Experimente wurde in der Tat bestätigt, daß der Defekt von H2 ts214 nicht in einem Protein liegt, das zur Elongation der DNA-Replikation benötigt wird (Abb. 9). Es wurde gezeigt, daß zum Zeitpunkt einer Temperaturerhöhung replizierende DNA-Moleküle unter restriktiven Bedingungen mit derselben Geschwindigkeit fertig repliziert werden wie wt DNA. Dieser Befund ist ein deutlicher Hinweis, daß das Genprodukt von H2 ts214 für die Initiation der viralen DNA-Replikation, aber nicht für Kettenverlängerung benötigt wird.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Beobachtungen an den Initiationsmutanten H12 ts A275 (Shiroki und Shimojo, 1974, Ariga und Shimojo, 1977), H5 ts125 (van der Vliet und Sussenbach, 1975) und H31 ts A13 (Suzuki und Shimojo, 1973), die ergaben, daß nach 2-stündiger Inkubation unter nicht-permissiven Bedingungen zum Zeitpunkt der Temperaturerhöhung replizierende DNA-Moleküle im alkalischen Sucrosegradienten als intakte DNA mit einer Sedimentationskonstante von 34 S sedimentieren.

Durch "shift-down"-Experimente konnte überdies gezeigt werden, daß es möglich ist, die DNA-Synthese der unter restriktiven Bedingungen akkumulierten fertigen DNA-Moleküle unmittelbar nach Temperaturerniedrigung synchron neu zu initiieren (Tab. 4, Abb. 10 und 11).

Analysen von Sedimentationsprofilen, BND-Cellulosechromatographie und Verteilung der Radioaktivität entlang dem viralen Genom bestätigten, daß die neusynthetisierte DNA ein Produkt der ersten Replikationsrunde und nicht einer späteren Replikationsrunde der wenigen DNA-Moleküle, die bei der limitierten DNA-Synthese bei 39.5°C beteiligt sind, darstellt. Analysen von neusynthetisierter, radioaktiv markierter DNA mit dem Restriktionsenzym Hpa I zeigten, daß für die virale DNA-Replikation 2 Ursprungsorte existieren, die an oder nahe an den beiden Enden des viralen Genoms liegen.

Der Einbau von Radioaktivität in replizierende DNA-Moleküle erfolgt strangspezifisch. Im Hpa I-E-Fragment, das das linke Ende des Ad 2-Genoms repräsentiert, wird der 1-Strang präferentiell markiert (Abb. 14). Diese Befunde stehen in Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die neuerdings ebenfalls die Replikationsursprungsorte der Ad-DNA an beiden physikalischen Enden des Virusgenoms kartieren konnten (Winnacker, 1978, Flint, 1979). Diese Untersuchungen, bei denen Einzelstranganteile von replizierenden DNA-Molekülen mit den getrennten Komplementärsträngen von Ad-DNA hybridisiert wurden, zeigten, daß beide molekulare Enden der Ad 2 DNA (Lavelle et al., 1975, Tolun und Petterson, 1975) und Ad 5 DNA (Sussenbach et al., 1976) Replikationsursprungsorte darstellen.

Diese Ergebnisse wurden durch Analysen bestätigt, bei denen die Radioaktivitätsverteilung in ^3H -Thymin pulsmarkierten, terminierten DNA-Molekülen gemessen wurde (Horwitz, 1976, Weingärtner et al., 1976) und durch

Methoden, die es erlauben, Replikationsursprungsorte direkt aus replizierenden DNA-Molekülen zu isolieren (Weingärtner, 1977, Winnacker, 1978, Reiter et al., 1980). Auch Synchronisationsexperimente mit den ts-Mutanten H5 ts125 (Sussenbach und Kuijk, 1978) und H12 ts A275 (Ariga und Shimojo, 1977) bestätigen, daß die Initiation der DNA-Replikation an beiden molekularen Enden des viralen Genoms erfolgt, wobei die beiden Enden mit gleicher Häufigkeit für die Initiation der DNA-Synthese verwendet werden.

Diese Befunde werden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen unterstützt, bei denen partielle Denaturierungsmuster zeigen, daß im Doppelstranganteil der Typ II-Moleküle beide Genomenden mit gleicher Häufigkeit vertreten sind (Lechner und Kelly, 1977).

Die hier zusammengefaßten Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den ursprünglichen Beobachtungen von Sussenbach und Mitarbeitern (Sussenbach et al., 1973, Ellens et al., 1974, Sussenbach et al., 1974), die ausschließlich das rechte molekulare Ende als Startpunkt der "displacement"-Synthese bei der Ad 5 DNA-Replikation vorsehen.

Inzwischen konnten von der gleichen Arbeitsgruppe beide molekularen Enden der Ad 5-DNA als Initiationsorte der DNA-Replikation ausgemacht werden (Sussenbach et al., 1976).

Die Ursache für diesen Widerspruch ist nicht bekannt. Bei den Versuchen, die das molekulare rechte Ende als Initiationsort der DNA-Synthese bestimmten, wurden Kernsysteme verwendet, die nicht in der Lage sind, DNA-Replikation zu initiieren. Es wird diskutiert, daß diese Systeme auch bezüglich anderer Faktoren defekt sein könnten und deshalb nur eine Sorte an replizierenden DNA-Molekülen isoliert wurde. Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen könnten die getrennten, viralen DNA-Stränge kontaminiert gewesen sein (Sussenbach et al., 1976).

Ungeklärt ist weiterhin, ob nicht zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion, wenn nicht qualitative, so doch quantitative Unterschiede in den einzelnen Phasen des Replikationsmechanismus bestehen könnten.

Analysen der Strangverteilung von Radioaktivität in terminalen Fragmenten aus pulsmarkierten, replizierenden DNA-Molekülen ergaben, daß am molekularen linken Ende des Strangs, der das 5'-Ende des Genoms trägt, etwa 70 % der inkorporierten Radioaktivität angehören (Abb. 14). Die Eingrenzung des analysierten Bereichs liegt am linken Ende der Ad 2 DNA mit

4.5 % der Genomlänge (Fragment Hpa I-E) bei 1600 Basenpaaren, so daß der Prozeß der Initiation nicht bis zum terminalen 5'-Nukleotid verfolgt werden kann. Weingärtner (1977) gelang es, den Initiationsbereich von Ad 2 auf 260 Basenpaare (Fragment Bal I-O) am linken und 550 Basenpaare (Fragment Hpa I-G) am rechten molekularen Ende einzuengen (Reiter et al., 1980).

In einer Untersuchung von neusynthetisierter Ad 12-DNA mit entsprechenden Endo- und Exonukleasen, die es ermöglichten, spezifisch die Oligonukleotide, die das 5'-Ende des viralen Genoms enthalten, zu isolieren, wurde gezeigt, daß DNA-Replikation von Ad 12 20 - 50 Nukleotide vom molekularen Ende entfernt beginnt (Ariga und Shimojo, 1978).

Dieses Ergebnis würde man erwarten, wenn das von Cavalier-Smith (1974) vorgeschlagene "Hairpin"-Modell zur Initiation der DNA-Replikation zuträfe (Abb.3A). Dieses Modell fordert ausgedehnte palindrome Sequenzen innerhalb der invertierten terminalen Repetition. Durch Sequenzanalysen konnten aber weder bei Ad 2 (Arrand and Roberts, 1979, Tolun et al., 1979) noch bei Ad 5 (Steenbergh et al., 1977) palindrome Sequenzen von mehr als 5 Basen gefunden werden.

Versuche, die den Initiationsbereich weiter als 260 Basenpaare am linken und 550 Basenpaare am rechten Ende des Genoms einengen, sind von Ad 2 nicht beschrieben. Die Frage, ob die DNA-Replikation direkt an den molekularen Enden des Ad 2-Genoms beginnt, bleibt daher weiterhin ungeklärt.

Auf Grund dieser Ergebnisse und elektronenmikroskopischer Untersuchungen (Lechner und Kelly, 1977) läßt sich folgender Replikationsweg, der mit dem Modell der "Displacement"-Synthese übereinstimmt, formulieren (Abb. 2). Die Initiation der DNA-Replikation erfolgt an beiden Genomenden mit gleicher Häufigkeit. Die semikonservative Replikation des viralen r-Stranges wird am rechten Genomende initiiert und erfolgt über die gesamte Genomlänge zum Replikationsterminus am linken Genomende. Hierbei verdrängt der wachsende Tochterstrang in zunehmendem Maße den parentalen r-Strang, der am replizierenden Molekül als Einzelstrang exponiert und schließlich vollständig abgelöst wird. Aufgrund der invertierten, terminalen Repetition des Ad 2-Genoms (Garon et al., 1972, Wolfson und Dressler, 1972) können sich die beiden Enden des losgelösten parentalen r-Stranges durch intramolekulare Basenpaarungen miteinander verbinden, so daß eine tennisschlägerähnliche Struktur ("panhandle") entsteht. Damit gleichen die doppelsträngigen Enden des "panhandles" den doppel-

strängigen Genomenden eines normalen, viralen DNA-Moleküls, so daß daran die Replikation des viralen 1-Stranges initiiert werden kann, dessen Synthese über die gesamte Genomlänge von links nach rechts verläuft. Auf diese Weise sind aus einem parentalen DNA-Molekül durch "displacement-" und "complementary strand"-Synthese 2 DNA-Tochtermoleküle entstanden.

Die Funktion des Proteins, das in H2 ts214-infizierten Zellen thermolabil ist, ist noch nicht bekannt. Da H2 ts214 und H5 ts125 verschiedenen Komplementationsgruppen angehören (Winnacker, 1978), ist auszuschließen, daß der Defekt im DNA-bindenden Protein liegt. Andere virale Funktionen, die für die Initiation der viralen DNA-Replikation notwendig sind, sind bisher nicht bekannt.

DNA-Replikation IN VITRO

Aus Ad 2-infizierten Zellen wurde ein lösliches Enzymsystem entwickelt, das an exogen zugesetzter DNA, die aus gereinigten Viruspartikeln isoliert wurde, DNA-Replikation durchführen kann.

Diese Fähigkeit, DNA einer exogen zugesetzten Matriz zu replizieren, steht im Gegensatz zu allen bisher bekannten eukaryotischen Replikationssystemen mit Ausnahme eines Multienzymsystems, das aus dem Cytoplasma von *Xenopus laevis*-Eiern isoliert wurde (Benbow et al., 1978). Während die Methode zur IN VITRO-DNA-Replikation von Ad 2 entwickelt wurde, erschien eine Veröffentlichung von Challberg und Kelly (1979), in der ein lösliches Enzymsystem aus Ad 5-infizierten Zellen beschrieben wurde, das zur Replikation von exogener Ad 5-DNA in der Lage ist. Die von Challberg und Kelly beschriebenen Befunde stimmen weitgehend mit den von mir gefundenen Ergebnissen überein.

Bisher waren für Ad-DNA-Replikation Kernsysteme und lösliche Systeme beschrieben, die zur Neusynthese von endogener Matrizen-DNA in der Lage sind. Alle diese Systeme können jedoch nur Elongations- und Terminationsschritte durchführen und sind nicht in der Lage, neue Replikationsrunden zu initiieren (Winnacker, 1978, Flint, 1979). Da das hier vorgestellte System exogen zugesetzte DNA replizieren kann, ist anzunehmen, daß es in der Lage ist, DNA-Replikation IN VITRO zu initiieren.

Einige Charakteristika des hier beschriebenen Systems bestätigen seine biologische Bedeutung. Für die DNA-Replikation IN VITRO müssen Extrakte verwendet werden, die aus Ad 2-infizierten Zellen eluiert wurden. Benutzt man für die IN VITRO-Replikation Extrakte aus uninfizierten Zellen, wird keine DNA synthetisiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß für die DNA-Synthese IN VITRO viruskodierte Protein(e) oder virus-induzierte, zelluläre Proteine notwendig sind. Es konnte gezeigt werden, daß das DNA-bindende Protein für die DNA-Replikation IN VITRO notwendig ist (Kaplan et al., 1979, Ariga et al., 1980).

Ein besonderes Kennzeichen des IN VITRO-Replikationssystems ist die Notwendigkeit für einen Ad-DNA-Proteinkomplex als Substrat.

Ad-DNA-Proteinkomplexe werden aus gereinigten Viruspartikeln isoliert und bestehen aus doppelsträngiger DNA, an deren 5'-Enden ein Protein mit dem Molekulargewicht 55.000 Daltons kovalent gebunden ist (Robinson et al., 1973, Sharp et al., 1976, Carusi, 1977, Padmanabhan und Padmanabhan, 1977, Rekosh et al., 1977). In Abwesenheit von DNA findet keine DNA-Synthese statt. Setzt man proteinfreie DNA als Matrize für die DNA-Replikation IN VITRO ein, ist die DNA-Synthese um etwa 80 % reduziert. Die limitierte DNA-Synthese, die dabei zu beobachten ist, gleicht nicht der DNA-Synthese IN VIVO, da das Syntheseprodukt im alkalischen Gradienten als niedermolekulares Material sedimentiert (Abb. 28). Diese Befunde wurden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt (Challberg und Kelly, 1979a). Setzt man proteinfreie DNA als Substrat für die DNA-Replikation IN VITRO ein, werden keine Typ I-Moleküle, die bei der DNA-Replikation IN VIVO (Lechner und Kelly, 1977) und IN VITRO bei Verwendung von DNA-Proteinkomplex als Substrat (Challberg und Kelly, 1979a) vorkommen, beobachtet. Setzt man proteinfreie DNA als Matrize für die DNA-Replikation IN VITRO ein, ist die eingebaute Radioaktivität auch nach kurzen Inkubationszeiten gleichmäßig über das virale Genom verteilt, was auf Reparatursynthesen an der Matrix-DNA und nicht auf Neusynthese von DNA hindeutet (Kaplan et al., 1979, Challberg und Kelly, 1979a).

Daß für DNA-Replikation IN VITRO ein DNA-Proteinkomplex als Substrat notwendig ist, deutet auf eine Funktion des terminalen Proteins bei der Initiation der DNA-Replikation hin. Indirekte Methoden ergaben den Hinweis, daß an die IN VITRO neusynthetisierte DNA an den beiden Enden ebenfalls ein Protein(e) assoziiert ist, wahrscheinlich mit demselben

Molekulargewicht wie das terminale Protein (Abb. 37). Bei Untersuchungen der IN VITRO-DNA-Replikation mit ^{35}S -markierten Extrakten, wurde der Hauptanteil der radioaktiven Markierung an den beiden terminalen Randfragmenten nachgewiesen (J. Fütterer, persönliche Mitteilung).

Auf Grund dieser Ergebnisse könnte man sich vorstellen, daß durch Wechselwirkung des terminalen Proteins an der DNA-Matrize mit Replikationsproteinen, die in der infizierten Zelle vorhanden sind, die Initiation der DNA-Replikation IN VITRO ermöglicht wird, wie es nach dem Modell von Rekosh et al. (1977) (Abb. 3B) auch gefordert wird.

Bezüglich des terminalen Proteins kann eine Übereinstimmung zwischen IN VIVO- und IN VITRO-DNA-Replikation gezeigt werden. Auch unter IN VIVO-Bedingungen ist replizierende DNA mit Protein assoziiert (Girard et al., 1977, Stillmann et al., 1977, Fütterer, 1978, Robinson et al., 1979, Stillmann und Bellet, 1979, van Wielink et al., 1979, Yamashita et al., 1979, Reiter et al., 1980).

Der Nachweis, daß unter IN VITRO-Bedingungen DNA-Replikation und nicht nur unspezifische Reparatursynthese stattfindet, wurde durch Sedimentationsanalysen im alkalischen Sucrosegradienten und Fragmentierung der neusynthetisierten DNA mit Restriktionsenzymen erbracht (Abb. 28 und 29). U-förmige Verteilungen der inkorporierten Radioaktivität entlang dem viralen Genom (Abb. 30) zeigen, daß auch unter IN VITRO-Bedingungen die Initiation der DNA-Replikation an oder nahe an beiden Enden des viralen Genoms mit etwa gleicher Häufigkeit erfolgt. Der Einbau von Radioaktivität erfolgt präferentiell in jeweils dem Strang, der das 5'-Ende des viralen Genoms enthält.

Daß bei der Verwendung von DNA-Proteinkomplexen oder proteinfreier DNA bei der DNA-Replikation IN VITRO unterschiedliche Syntheseprodukte entstehen, ist ein deutlicher Hinweis, daß exogene DNA und nicht aus infizierten Zellen eluierte endogene DNA als Matrize für die DNA-Synthese dient. Dies wurde durch Versuche bestätigt, bei denen Ad 5-DNA-Proteinkomplex mit Extrakten aus Ad 2-infizierten Zellen inkubiert wurde. Analysen des Reaktionsproduktes mit dem Restriktionsenzym Hpa I ergaben ein für Ad 5 typisches Fragmentierungsmuster (Abb. 32).

Durch Analysen der Einbaugeschwindigkeiten von radioaktiven Vorläufern in die Restriktionsfragmente Hpa I-E und Hpa I-G des IN VITRO-Produktes

nach der bei Robinson et al (1979) beschriebenen Methode (3.14.4) läßt sich bei einer Inkubationstemperatur von 30°C eine Einbaurrate von 550 - 660 Nukleotiden pro Minute errechnen. Daher müßte die Dauer einer Replikationsrunde 53 - 66 Minuten betragen. Tatsächlich findet man nach einem 60-minütigen Puls eine annähernd gleichmäßige Verteilung des relativen Radioaktivitätseinbaus über das gesamte Genom (Abb. 30).

Es wurde gezeigt, daß die DNA-Replikation IN VITRO temperaturabhängig ist (Abb. 24). Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C ist die Syntheserate im Vergleich zu 30°C verdoppelt. Man würde daher bei einer Reaktionstemperatur von 37°C eine Einbaurrate von 1050 - 1300 Nukleotiden pro Minute erwarten. In Übereinstimmung damit finden Challberg und Kelly (1979a) in elektronenmikroskopischen Untersuchungen Einbauraten von 1250 Nukleotiden/min und durch Messung der Einbaukinetiken von radioaktiven Vorläufern 1100 - 1200 Nukleotide pro Minute, wenn die Inkubationstemperatur der IN VITRO-DNA-Synthese 37°C beträgt.

Bei 37°C beträgt die Geschwindigkeit der DNA-Replikation IN VIVO 1100 - 1200 Nukleotide/min (Pearson, 1975, Weingärtner et al., 1976, Bodnar und Pearson, 1980), d.h. daß die IN VIVO und IN VITRO-DNA-Syntheseraten übereinstimmen.

Bezüglich der Ausbeute arbeitet ein IN VIVO-System nach wie vor viel effizienter. Aus Ad 2-infizierten Zellen können im Maximum der DNA-Replikation bis etwa 500.000 DNA-Moleküle pro Zelle isoliert werden (Fanning und Doerfler, 1977). Dagegen werden unter IN VITRO-Bedingungen etwa 800 DNA-Moleküle pro Zelle synthetisiert, wenn man die Ausbeuten auf die Menge an zugesetzten Extrakten bezieht.

Nur ein Teil der eingesetzten Matrizen-DNA scheint bei der DNA-Replikation IN VITRO beteiligt zu sein. Der maximale Einbau von Nukleotiden in DNA entspricht etwa 20 - 30 % der exogenen DNA. Trotzdem ist die durchschnittliche Kettenlänge der neusynthetisierten DNA länger als 20 - 30 % der Genomlänge.

Für diese begrenzte Verwendung von angebotenen DNA-Molekülen als Matrize für die DNA-Replikation IN VITRO gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten: Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich unter der Matrizen-DNA, die aus Viruspartikeln isoliert wurde, DNA-Moleküle befinden, die kurz vor der Verpackung in die Virushülle DNA-Synthese noch IN VIVO initiiert hatten. Solche präinitiierten DNA-Moleküle könnten das abschließliche Substrat für die IN VITRO-DNA-Replikation darstellen. Es

könnte aber auch sein, daß bei der Isolierung der DNA-Proteinkomplexe aus den Viruspartikeln teilweise essentielle Replikationsproteine inaktiviert wurden. Es ist aber auch möglich, daß notwendige Komponenten aus dem Extrakt auf die Initiation der DNA-Replikation IN VITRO limitierend wirken.

Bei der Analyse der Strangverteilung von neueingebauter Radioaktivität in verschiedene terminale Ad 2-Fragmente wurden etwa 75 % der Radioaktivität in jeweils dem Strang, der das 5'-Ende des viralen Genoms trägt, gefunden und etwa 25 % in dem dazugehörigen komplementären Strang (Abb. 31, Tab. 7). Es wurde auch gezeigt, daß während der DNA-Replikation IN VITRO etwa 7 % der exogenen Matrizen-DNA abgebaut werden (Abb. 27). Diese 2 Beobachtungen führten zu der Annahme, daß die DNA-Replikation, die spezifisch an den 5'-Enden der DNA beginnt, mit Reparatursynthese gekoppelt ist. Dieser Befund könnte folgende Ursachen haben:

- a) Bei der Isolierung der DNA-Proteinkomplexe oder durch in den Extrakten vorhandene Nukleasen könnten vereinzelt Einzelstrangbrüche und -lücken entstanden sein, wobei die resultierenden 3' OH-Enden als Primer für die Reparatursynthese dienen.
- b) Extrakte, die für die IN VITRO DNA-Replikation verwendet werden, werden aus Ad 2-infizierten HeLa-Zellen gewonnen, denen 2 Stunden nach Infektion 10 mM Hydroxyharnstoff zugesetzt wird. Es ist beschrieben, daß durch Hydroxyharnstoff die Reparatursynthese in menschlichen Zellen stimuliert wird (Smith und Hanawalt, 1977, Andrae und Greim, 1979). Bei der DNA-Replikation IN VITRO zeigen Extrakte aus hydroxyharnstoffgehemmten Zellen im Vergleich zu ungehemmten Extrakten eine Stimulierung der DNA-Syntheserate um 100 % (Abb. 19). Ob dieser erhöhte Einbau von dTMP in säureunlösliches Material auf eine Stimulierung der Reparatursynthese zurückzuführen ist, wurde nicht untersucht. Man könnte sich aber vorstellen, daß die Anwesenheit von Hydroxyharnstoff in den infizierten Zellsuspensionen zu einer erhöhten Synthese von Reparaturenzymen führt. Diese können bei der Extraktion aus den Zellen eluiert werden und Reparatursynthese an der exogenen Matrizen-DNA stimulieren.

Verwendet man für die DNA-Replikation IN VITRO proteinfreie DNA als Matrize, ist die Syntheserate um etwa 80 % erniedrigt (Abb. 20). Die eingebaute Radioaktivität läßt sich auf Reparatursynthese zurückführen

(Kaplan et al., 1979, Challberg und Kelly, 1979a). Es ist nicht auszuschließen, daß in einem System, in dem ein DNA-Proteinkomplex als Matrix eingesetzt wird, neben hauptsächlich Replikationssynthese auch unspezifische Reparatursynthese abläuft, zumal auch bei kurzen Inkubationszeiten in die internen Fragmente der Ad-DNA Radioaktivität eingebaut wird (Kaplan et al., 1979, Challberg und Kelly, 1979a).

Diese Befunde, daß bei der DNA-Replikation IN VITRO Radioaktivität nicht nur in den Strang, der das 5'-Ende des viralen Genoms trägt, eingebaut wird, sondern auch in den jeweils komplementären Strang, wurde auch bei verschiedenen Systemen zur Untersuchung der DNA-Replikation IN VIVO beobachtet.

Untersuchungen an der Mutante H2-ts214, bei der die virale DNA Synthese durch geeignete Temperaturveränderungen synchronisiert worden war, ergaben für die neuintiierte, replizierende DNA eine Verteilung der Radioaktivität in den beiden komplementären Einzelsträngen des Hpa I-E-Fragmentes von 7 (schneller Strang) : 3 (langsamer Strang) (Tab. 5).

Durch Analysen der Strangverteilung der eingebauten Radioaktivität in die terminalen Fragmente Hpa I-G, Hpa I-E und Bal I-O von replizierenden viralen Ad 2-DNA-Molekülen konnte Weingärtner (1977) zeigen, daß am rechten Ende etwa 25 % der Radioaktivität im viralen l-Strang und am linken Ende etwa 25 % im viralen r-Strang inkorporiert waren (Winnacker, 1978).

Bei der Analyse von pulsmarkierter, terminierter Ad 2-DNA fand Horwitz (1976) eine Radioaktivitätsverteilung von 2.3 : 7.8 in den beiden komplementären Strängen des Hpa I-E-Fragmentes.

Da in dem beschriebenen IN VITRO-System und in 3 verschiedenen IN VIVO-Systemen etwa 25 % der Radioaktivität in jeweils dem "falschen" Strang inkorporiert waren, könnte man sich einen allgemeinen Mechanismus der Kopplung von Replikationssynthese und Reparatursynthese vorstellen, der für die fehlerfreie Weitergabe der genetischen Information unerlässlich ist.

DNA-Replikation und Transkription können nur ablaufen, wenn die Helixstruktur der DNA vorübergehend partiell aufgehoben wird. Um bei diesem Prozeß die Fehlerquote so gering wie möglich zu halten, könnten sich einmal Mechanismen entwickelt haben, die die Anzahl an hierfür notwendigen Brüchen der DNA so klein wie möglich halten. Andererseits könnte es aber von größerem Vorteil sein, gelegentliche Brüche in der DNA hinzu-

nehmen und die Genauigkeit in der Basensequenz durch sehr effiziente Reparaturmechanismen zu gewährleisten. Obwohl der Ablauf der DNA-Replikation (Sheinin und Humbert, 1978) und Reparatur (Hanawalt et al., 1979) sehr intensiv untersucht ist, ist über die bei normaler DNA-Replikation ablaufende Reparatursynthese wenig bekannt.

Durch Experimente, bei denen E.coli DNA-Replikation in Gegenwart von $H_2^{18}O$ und ^{32}P -Phosphat durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, daß während einer Replikationsrunde in der DNA-Kette von 7000 Phosphatresten einer ausgetauscht und von 100 - 500 Basen eine hydrolytisch gespalten wurde (Strayer und Boyer, 1978). Diese Beobachtung, daß bei der Replikation von Prokaryonten die DNA-Matrize nicht völlig stabil bleibt, könnte auch für eukaryotische Systeme von Bedeutung sein, obwohl die in diesem System gegebenen Größenordnungen meine Beobachtungen nur zu einem kleinen Teil erklären könnten.

Okazaki et al. (1968) zeigten erstmals, daß die Kettenverlängerung während der DNA-Replikation von E.coli diskontinuierlich erfolgt, d.h. daß kurzzeitig DNA-Fragmente ("Okazaki-Fragmente") gebildet und mit den entstehenden DNA-Strängen verknüpft werden.

In isolierten Zellkernen und in Ad 2- oder Ad 5-infizierten Zellen wurde in Gegenwart von Hydroxyharnstoff nach einem einminütigen radioaktiven Puls DNA isoliert, die im alkalischen Sucrosegradienten mit 10 - 12 S sedimentiert und von beiden Strängen des gesamten Genombereiches stammt, was als diskontinuierliche DNA-Synthese interpretiert wurde (Winnacker, 1974, 1975, Vlak et al., 1975), die aber für eine "displacement"-Synthese nicht notwendig ist. Tye et al. (1977) ziehen aus Untersuchungen mit dUTPase-negativen E.coli-Mutanten den Schluß, daß Okazaki-Fragmente auch bei Wildtyporganismen (Tye und Lehmann, 1977) als Ergebnis eines Excisions-Reparaturmechanismus entstehen.

Man könnte nun postulieren, daß die 10 - 12 S-Fragmente, die nach kurzen Pulsen in Ad-infizierten Zellen nachzuweisen sind, auf Excisions-Reparatursynthese zurückzuführen sind. Damit würde auch verständlich, daß wegen der gleichzeitig mit der Replikation ablaufenden Reparatursynthese auch in den Fragmentsträngen, die das 3'-Ende des viralen Genoms tragen, Radioaktivität eingebaut wurde (Abb. 14 und 31) (Horwitz, 1976, Weingärtner, 1977, Winnacker, 1978).

Die hier beschriebenen Extrakte aus Ad 2-infizierten Zellen können nur in Gegenwart von exogener DNA synthetisieren. Dabei ist es unerheblich, ob Ad 2-DNA oder Ad 5-DNA, die 99 - 100 % homolog sind (Green et al., 1979), als Matriz e eingesetzt wird. Dieses System erscheint besonders geeignet, Untersuchungen über Strukturmerkmale von DNA, die für die DNA-Replikation notwendig sind, durchzuführen.

DNA eines Mausadenovirus, Ad FL zeigt weniger als 10 % Homologie mit Ad 2 DNA (Larsen und Nathans, 1977, Larsen et al., 1979). Führt man DNA-Replikation IN VITRO mit Ad FL-DNA-Proteinkomplex als Matriz e und Extrakten aus Ad 2-infizierten Zellen durch, wird dennoch DNA synthetisiert (Abb. 34 und 35). Durch Strangtrennungen der terminalen Fragmente konnte auch bei Ad FL-DNA eine asymmetrische Verteilung der inkorporierten Radioaktivität auf die beiden komplementären Stränge nachgewiesen werden (Abb. 36, Tab. 8). Damit wurde gezeigt, daß Ad FL-DNA von dem Ad 2-Replikationssystem erkannt und repliziert wird.

Die terminalen Repetitionen der Ad-DNA von verschiedenen menschlichen Serotypen besitzen große Homologien (Tolun et al., 1979). Dies gilt auch für Vertreter verschiedener Gruppen, deren DNA über das gesamte Genom wenig Homologien zeigen (Green et al., 1979) und einem Affenadenovirus, SA 7. Konservierte Regionen sind hauptsächlich in den ersten 50 Basenpaaren an den beiden Enden des viralen Genoms vorhanden, wobei die Basen 9 - 17 bei allen untersuchten Adenoviren identisch sind. Sequenzanalysen von Ad FL zeigten, daß auch hier die ersten 17 Basen mit denen von Ad 2 identisch sind (Temple et al., 1980). Andere Homologieregionen innerhalb der terminalen Repetition scheinen bei Ad FL zu fehlen (Abb. 33).

Homologieregionen wurden auch in dem Bereich der Replikationsursprungsorte der zirkulären Genome von SV 40, BKV, ϕ X 174 und Col E1 gefunden (Langeveld et al., 1978, Tolun et al., 1979, Seif et al., 1979). Spekulationen, nach denen diese Regionen Erkennungssequenzen für die Initiation der DNA-Replikation darstellen, erscheinen deshalb sehr attraktiv.

In diesem Zusammenhang sei bemerkt, daß alle diese Organismen, an denen homologe Sequenzen an den Replikationsursprungsorten nachgewiesen wurden, an das 5'-Ende ihre DNA ein Protein kovalent gebunden haben. Bei den doppelsträngigen, zirkulären Genomen von SV 40, BKV, ϕ X 174 und Col E1 wird nach spezifischer Spaltung eines der beiden DNA-Stränge das jeweilige Protein an das 5'-Ende der DNA gebunden (Blair et al., 1971,

Kasamatsu und Wu, 1976, Eisenberg et al., 1977, Langeveld et al., 1978, Seif et al., 1979).

Die Frage nach der Bedeutung der konservierten Homologieregionen sollten mit Deletionsmutanten und mit dem hier beschriebenen IN VITRO-Replikationssystem zu lösen sein, wenn man definierte DNA-Fragmente als Matrize verwendet. Daneben sollte es die Entwicklung dieses IN VITRO-Replikationssystems ermöglichen, virale und zelluläre Proteine, die an der DNA-Replikation beteiligt sind, anzureichern und zu charakterisieren, um Verständnis über den Mechanismus von viraler und zellulärer DNA-Replikation zu gewinnen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe dieser Arbeit war es, im Zusammenhang mit Untersuchungen zum Mechanismus der Initiation der Adenovirus DNA-Replikation eine temperatursensitive Mutante mit einem Defekt in der viralen DNA-Replikation bezüglich ihrer Wachstumseigenschaften unter permissiven und restriktiven Bedingungen zu charakterisieren. Durch Temperatur-"shift"-Experimente konnte gezeigt werden, daß der Defekt der Mutante in der Initiation der DNA-Replikation lag, und daß es möglich war, die DNA-Replikation der unter nicht-permissiven Bedingungen akkumulierten DNA-Moleküle durch Temperaturniedrigung synchron neu zu initiieren. Es konnte bestätigt werden, daß sich die Ursprungsorte der Adenovirus Typ 2-DNA-Replikation an oder nahe an beiden molekularen Enden des viralen Genoms befinden, wobei die beiden Enden mit gleicher Häufigkeit für die Initiation der DNA-Replikation verwendet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein lösliches Enzymsystem entwickelt, das in der Lage ist, exogen zugesetzte DNA, die aus gereinigten Viruspartikeln isoliert wurde, zu replizieren. Dieses System wurde an IN VIVO-Parametern gemessen, wobei eine Übereinstimmung in allen untersuchten Eigenschaften gefunden wurde. Es konnte gezeigt werden, daß ein Adenovirus-DNA-Proteinkomplex bevorzugtes Substrat für die DNA-Replikation IN VITRO ist. Auch unter IN VITRO-Bedingungen wird die DNA-Replikation an beiden molekularen Enden der viralen DNA initiiert. Die Verteilung von Radioaktivität in den komplementären Strängen IN VITRO-pulsmarkierter DNA war asymmetrisch. Daraus kann man schließen, daß die Synthese des viralen r-Stranges am rechten molekularen Ende initiiert wird und über die gesamte Genomlänge zum Replikationsterminus des linken Genomendes verläuft. Analog wird die Synthese des viralen l-Stranges am linken molekularen Ende der DNA initiiert und erfolgt über die gesamte Genomlänge zum Replikationsterminus des rechten Endes.

7. LITERATURHINWEISE

Abboud, M.M. and Horwitz, M.S., 1979. The DNA-polymerases associated with the adenovirus type 2 replication complex: effect of 2'-3'-dideoxythymidine-5'-triphosphate on viral DNA synthesis.

Nucl. Acid Res. 6, 1025-1039

Adams, R.L.P. and Lindsay, J.G., 1967. Hydroxyurea: Reversal of inhibition and use as a cell-synchronizing agent.

J. Biol. Chem. 242, 1314-1317

Aiello, L., Guilfoyle, R., Huebner, K. and Weinmann, R., 1979. Adenovirus 5 DNA sequences present and RNA sequences transcribed in transformed human embryo kidney cells (HEK-Ad-5 or 293).

Virology 94, 460-469

Anderson, C.W., Baum, P.R. and Gesteland, R.F., 1973. Processing of adenovirus 2 induced proteins.

J. Virol. 12, 241-252

Andrae, U. and Greim, H., 1979. Induction of DNA repair replication by hydroxyurea in human lymphoblastoid cells mediated by liver microsomes and NADPH.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 87, 50-58

Antoine, G., 1979. Primärstruktur der molekularen Enden von Maus Adenovirus DNA. Diplomarbeit, Biochemisches Institut der Universität München.

Arens, M., Yamashita, T., Padmanabhan, R., Tsuruo, T. and Green, M., 1977. Adenovirus deoxyribonucleic acid replication. Characterization of the enzyme activities of a soluble replication system.

J. Biol. Chem. 252, 7947-7954

Arens, M. and Yamashita, T. 1978. IN VITRO termination of adenovirus DNA synthesis by a soluble replication complex.

J. Virol. 25, 698-702

Ariga, H. and Shimojo, H., 1977. Initiation and termination sites of adenovirus 12 DNA replication.

Virology 78, 415-424

Ariga, H. and Shimojo, H., 1978. Initiation and termination of adenovirus 12 replication. II. Analysis of pulse-labeled oligonucleotides derived from 5' termini in the DNA strand.

Virology 85, 98-108

- Ariga, H., Klein, H., Levine, A.J. and Horwitz, M.S., 1980. A cleavage product of the adenovirus DNA binding protein is active in DNA replication IN VITRO
Virology 101, 307-310
- Arrand, J.E., 1978. Mapping of adenovirus type 5 temperature-sensitive mutations by marker rescue in enhanced double DNA infections.
J. Gen. Virol. 41, 573-586
- Arrand, J.R. and Roberts, R.J., 1979. The nucleotide sequence at the termini of adenovirus 2 DNA.
J. Mol. Biol. 128, 577-594
- Beck, W., Purucker, B. und Girnth, M., 1976. Synthese, IN VIVO- und IN VITRO-Untersuchungen zur tumorhemmenden Wirkung von cis-dichloro-dipeptidester-platin (II)-Komplexen.
Z. Naturforsch. 31b, 832-845
- Bellet, A.J.D. and Younghusband, H.B., 1972. Replication of the DNA of chick embryo lethal orphan virus.
J. Mol. Biol. 72, 691-709
- Benbow, R.M. and Ford, C.C., 1975. Cytoplasmic control of nuclear DNA synthesis during early development of Xenopus laevis: A cell free assay.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2437-2441
- Benbow, R.M., Krauss, M.R. and Reeder, R.H., 1978. DNA synthesis in a multiple-enzyme system from Xenopus laevis eggs.
Cell 13, 307-318
- Berget, S.M., Flint, S.J., Williams, J.F. and Sharp, P.A., 1976. Adenovirus transcription. IV. Synthesis of viral-specific RNA in human cells infected with temperature-sensitive mutants of adenovirus 5.
J. Virol. 19, 879-889
- Berk, A.D., Lee, F., Harrison, T., Williams, J.F. and Sharp, P.A., 1979. Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs.
Cell 17, 935-944
- Blair, D.G., Clewell, D.B., Sheratt, D.J. and Helinski, D.R., 1971. Strand-specific supercoiled DNA protein relaxation complexes: comparison of the complexes of bacterial plasmids colE1 and colE2.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 210-214

- Bodnar, J.W. and Pearson, G.D., 1980. Kinetics of adenovirus DNA replication. I. Rate of adenovirus DNA replication. *Virology* 100, 208-211
- Bolden, A., Aucher, J. and Weissbach, A., 1975. Synthesis of herpes simplex virus, vaccinia virus and adenovirus DNA in isolated HeLa cell nuclei. *J. Virol.* 16, 1584-1592
- Brandt, W.N., Flamm, W.G. and Bernheim, N.J., 1972. The value of hydroxyurea in assessing repair synthesis of DNA in HeLa cells. *Chem.-Biol. Interactions* 5, 327-339
- Brison, O., Kedinger, C. and Wilhelm, J., 1977. Enzymatic properties of viral replication complexes isolated from adenovirus type 2-infected HeLa cell nuclei. *J. Virol.* 24, 423-435
- Brown, D.T., Westphal, M., Burlingham, B.T., Winterhoff, U. and Doerfler, W., 1975. Structure and composition of the adenovirus type 2 core. *J. Virol.* 16, 366-387
- Brun, G. and Weissbach, A., 1978. Initiation of HeLa cell DNA synthesis in a subnuclear system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5931-5935
- Burlingham, B.T. and Doerfler, W., 1972. An endonuclease in cells infected with adenovirus and associated with adenovirions. *Virology* 48, 1-13
- Carter, T.H. and Ginsberg, H.S., 1976. Viral transcription in KB cells infected by temperature-sensitive "early" mutants of adenovirus type 5. *J. Virol.* 18, 156-166
- Carusi, E.A., 1977. Evidence for blocked 5'-termini in human adenovirus DNA. *Virology* 76, 380-394
- Casey, J. and Davidson, N., 1977. Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. *Nucl. Acid Res.* 4, 1539-1545

Cavalier-Smith, T, 1974. Palindromic base sequences and replication of eukaryotic chromosome ends.

Nature 250, 467-470

Challberg, M.D. and Kelly, Th.J., 1979. Adenovirus DNA replication IN VITRO.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 655-659

Challberg, M.D. and Kelly, Th.J., 1979a.

Adenovirus DNA replication IN VITRO. Origin and direction of daughter strand synthesis.

J. Mol. Biol. 135, 999-1011

Chinnadurai, G., Chinnadurai, S. and Green, M., 1978. Enhanced infectivity of adenovirus type 2 DNA and a DNA-protein complex.

J. Virol. 26, 195-199

DePamphilis, M.L. and Berg, P., 1975. Synthesis of superhelical simian virus 40 deoxyribonucleic acid in cell lysates.

J. Biol. Chem. 250, 4348-4354

Doerfler, W., 1969. Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK 21) with adenovirus type 12.

Virology 38, 587-606

Doerfler, W. and Kleinschmidt, A.K., 1970. Denaturation pattern of the DNA of adenovirus type 2 as determined by electron microscopy.

J. Mol. Biol. 50, 579-593

Doerfler, W., Hellmann, W. and Kleinschmidt, A.K., 1972. The DNA of Adenovirus type 12 and its denaturation pattern.

Virology 47, 507-512

Dulbecco, R. and Freeman, G., 1959. Plaque production by the polyoma virus.

Virology 8, 396-397

Dulbecco, R. and Vogt, M., 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.

J. Exp. Med. 99, 396-397

Eagle, H., 1959. Aminoacid metabolism in mammalian cell cultures.

Science 130, 432-437

Eisenberg, S., Griffith, J. and Kornberg, A., 1977. ϕ X 174 cistron A protein is a multifunctional enzyme in DNA replication.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3198-3202

Ellens, D.J., Sussenbach, J.S. and Jansz, H.S., 1974. Studies on the mechanism of replication of adenovirus DNA. III. Electron microscopy of replicating DNA.
Virology 61, 427-442

Ensinger, M.J. and Ginsberg, H.S., 1972. Selection and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of type 5 adenovirus.
J. Virol. 10, 328-339

Everitt, E., Sundquist, B., Petterson, U. and Philipson, L. 1973. Structural proteins of adenoviruses. X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2.
Virology 62, 130-147

Fanning, E. and Doerfler, W., 1977. Intracellular forms of adenovirus DNA. VI. Quantitation and characterization of the four-size-classes of adenovirus type 2 DNA in human KB cells.
Virology 81, 433-448

Flanagan, J.B., Petterson, R.F., Ambros, V., Hewlett, M.J. and Baltimore, D., 1977. Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of the virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 961-965

Flint, S.J., Berget, S.M. and Sharp, Ph.A., 1976. Characterization of single-stranded viral DNA sequences present during replication of adenovirus types 2 and 5.
Cell 9, 559-571

Flint, S.J., 1977. The topography and transcription of the adenovirus genome.
Cell 10, 153-166

Flint, S.J., 1979. The molecular biology of adenoviruses. in press

Fraser, J.M.K. and Huberman, J.A., 1977. IN VITRO HeLa cell DNA synthesis. Similarity to IN VIVO replication.
J. Mol. Biol. 117, 249-272

Frenkel, G.D., 1978. Adenovirus DNA synthesis IN VITRO in an isolated complex.

J. Virol. 25, 459-463

Friedman, D.L. and Mueller, G.C., 1968. A nuclear system for DNA replication from synchronized HeLa cells.

Biochim. Biophys. Acta 161, 455-468

Frost, E. and Williams, J., 1978. Mapping of temperature-sensitive and host-range mutations of adenovirus type 5 by marker rescue.

Virology 91, 39-50

Fütterer, J., 1978. DNA-Protein-Komplexe in adenovirus-infizierten HeLa-Zellen. Diplomarbeit, Biochemisches Institut der Universität München

Gallimore, P.H., Sharp, P.A. and Sambrook, J., 1974. Viral DNA in transformed cells. II. A study of the sequences of adenovirus 2 DNA in nine lines of transformed rat cells using specific fragments of the viral genome.

J. Mol. Biol. 89, 49-72

Galos, R.S., Williams, J., Binger, M.-H. and Flint, S.J., 1979. Location of additional early gene sequences in the adenoviral chromosome.

Cell 17, 955-956

Garon, C.F., Berry, K.W. and Rose, J.A., 1972. A unique form of terminal redundancy in adenovirus DNA molecules.

Proc. Natl. Acad. Sci USA 69, 2391-2395

Gellert, R.W. and Bau, R., 1975. The structure of the (Platinum (ethylenediamine) (guanosine)₂)²⁺ cation.

J. Amer. Chem. Soc. 97, 7379-7380

Gillam, J.O., Millward, S., Blew, D., von Tigerstrom, M., Timmer, E. and Tener, G.M., 1967. The separation of soluble ribonucleic acids on benzoylated diethylaminoethyl-cellulose.

Biochemistry 6, 3043-3056

Ginsberg, H.S., Williams, J.F., Doerfler, W. and Shimojo, H., 1973. Proposed nomenclature for mutants of adenoviruses.

J. Virol. 12, 663-664

Ginsberg, H.S., Ensinger, M.J., Kauffman, R.S., Mayer, A.J. and Lundholm U., 1974. Cell transformation: A study of regulation with types 5 and 12 adenovirus temperature-sensitive mutants.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 419-426

Ginsberg, H.S. and Young, C.S.H., 1976. Genetics of adenoviruses.
Adv. Cancer Res. 23, 91-126

Ginsberg, H.S. and Young, C.S.H., 1977. Genetics of adenoviruses.
In Comprehensive Virology, 9 (New York and London : Plenum Press) pp. 27-88

Girard, M., Bouché, J.-P., Marty, L., Revet, B. and Berthelot, N., 1977. Circular adenovirus DNA-protein complexes from infected HeLa cell nuclei.
Virology 83, 34-55

Graham, C.F., Arms, K. and Gurdon, J.B., 1966. The induction of DNA synthesis by frog egg cytoplasm.
Dev. Biol. 14, 349-381

Graham, F.L. and van der Eb, A.J., 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus DNA.
Virology 52, 456-467

Graham, F.L., Abrahams, P.J., Mulder, C., Heijneker, H.L., Warnaar, S.O., de Vries, F.A.J., Fiers, W. and van der Eb, A.J., 1974. Studies on the IN VITRO transformation by DNA and DNA fragments of human adenoviruses and simian virus 40.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 637-650

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.
J. gen. Virol. 36, 59-72

Graham, F.L., Harrison, T. and Williams, J., 1978. Defective transforming capacity of adenovirus 5 host-range mutants.
Virology 86, 10-21

Green, M. and Piña, M., 1964. Biochemical studies on adenovirus multiplication. VI. Properties of highly purified tumourgenic human adenoviruses and their DNAs.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 1251-1259

Green, M., Piña, M., Kimes, R., Wensink, P.C., McHattie, L.A. and Thomas, C.A., 1967. Adenovirus DNA, I. Molecular weight and conformation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57, 1302-1309

Green, M., Mackey, J.K., Wold, W.S.M. and Rigden, P., 1979. Thirty-one human adenovirus serotypes (Ad1-31) form five groups (A-E) based upon genome homologies.

Virology 93, 481-492

Grummt, F., 1978. Diadenosine 5',5'''-p₁,p₄-tetrphosphate triggers initiation of IN VITRO DNA-replication in baby hamster kidney cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 371-375

Grummt, F., Walti, G., Jantzen, H.-M., Hamprecht, K., Huebscher, U. and Kuenzle, C., 1979. Diadenosine 5',5'''-p₁,p₄-tetrphosphate, a ligand of the 57 kilodalton subunit of DNA polymerase α .

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6081-6085

Hanawalt, P.C., Cooper, P.K., Ganesan, A.K. and Smith, C.A., 1979. DNA repair in bacteria and mammalian cells.

Ann. Rev. Biochem. 48, 783-836

Harding, N.E., Junetsu, J. and David, G.S., 1978. Identification of the protein firmly bound to the ends of bacteriophage ϕ 29 DNA.

Virology 84, 279-292

Harrison, T., Graham, F. and Williams, J., 1977. Host-range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells.

Virology 77, 319-329

Hayward, G.S., 1972. Gel electrophoretic separation of the complementary strands of bacteriophage DNA.

Virology 49, 342-444

Hayward, G.S. and Smith, M.G., 1972. The chromosome of bacteriophage T5. I. Analysis of the single-stranded DNA fragments by agarose gel electrophoresis.

J. Mol. Biol. 63, 383-395

Hershey, H.V., Stieber, J.F. and Mueller, G.C., 1973. DNA synthesis in isolated HeLa nuclei. A system for continuation of replication IN VIVO.

Eur. J. Biochem. 34, 383-394

- Hillemann, M.R. and Werner, J.H., 1954. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85, 183-188
- Hirt, B., 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures.
J. Mol. Biol. 26, 365-369
- Horwitz, M.S., 1971. Intermediates in the replication of type 2 adenovirus DNA.
Virology 8, 675-683
- Horwitz, M.S., 1976. Bidirectional replication of adenovirus type 2 DNA.
J. Virol. 18, 307-315
- Horwitz, M.S., 1978. Temperature-sensitive replication of H5 ts125 adenovirus DNA IN VITRO
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4291-4295
- Huebner, R.J., 1967. Adenovirus-directed tumor and T-antigens.
In Perspectives in Virology, M. Pollard (ed.) 5, 147-166, Academic Press, New York
- Ikegami, S., Taguchi, T. and Ohashi, M., 1978. Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA-polymerase α
Nature 275, 458-459
- Ito, K., Arens, M. and Green, M., 1975. Isolation of DNA polymerase γ from an adenovirus 2 DNA replication complex.
J. Virol. 15, 1507-1510
- Ito, K., Arens, M. and Green, M., 1976. Characterization of DNA polymerase associated with nuclear membrane fractions from uninfected and adenovirus 2-infected KB cells.
Biochim. Biophys. Acta 447, 340-352
- Jazwinski, S.M. and Edelman, G.M., 1976. Activity of yeast extracts in cell-free stimulation of DNA replication.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3933-3936

Jazwinski, S.M., Wang, J.L. and Edelman, G.M., 1976. Initiation of replication in chromosomal DNA induced by extracts from proliferating cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2231-2235

Johnson, R.T. and Harris, H., 1969. DNA synthesis and mitosis in fused cells. II. HeLa-chick erythrocyte heterokaryons.

J. Cell. Sci. 5, 625-644

Jones, N. and Shenk, T., 1978. Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5.

Cell 13, 181-188

Jones, N. and Shenk, T., 1979. Isolation of adenovirus type 5 host-range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells.

Cell 17, 683-689

Kaplan, L.M., Ariga, H., Hurwitz, J. and Horwitz, M.S., 1979.

Complementation of the temperature-sensitive defect in H5 ts125 adenovirus DNA replication IN VITRO.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5534-5538

Kasamatsu, H. and Wu, M., 1976. Structure of a nicked DNA-protein complex isolated from simian virus 40: Covalent attachment of the protein to DNA and nick specificity.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1945-1949

Kathmann, H.-P., 1974. Isolation von temperatursensitiven Mutanten von Adenovirus Typ 2. Diplomarbeit, Institut für Genetik der Universität zu Köln.

Kathmann, H.-P., Schick, J., Winnacker, E.-L. and Doerfler, W., 1976.

Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of adenovirus type 2.

J. Virol. 19, 43-53

Kedinger, C., Brison, O., Perrin, F. and Wilhelm, J., 1978. Structural analysis of viral replicative intermediates isolated from adenovirus type 2-infected HeLa cell nuclei.

J. Virol. 26, 364-379

Landgraf-Leurs, M. and Green, M., 1971. Adenovirus DNA. III. Separation of the complementary strands of adenovirus 2, 7 and 12 DNA molecules.

J. Mol. Biol. 60, 185-202

Langeveld, S.A., van Mansfeld, A.D.M., Baas, P.D., Jansz, H.S., van Arkel, G.A. and Weisbeek, P.J., 1978. Nucleotide sequence of the origin of replication in bacteriophage ϕ X 174 RF DNA.
Nature 271, 417-420

Larsen, S.H. and Nathans, D., 1977. Mouse adenovirus: Growth of plaque-purified FL virus in cell lines and characterization of viral DNA.
Virology 82, 182-195

Larsen, S.H., Margolskee, R.F. and Nathans, D., 1979. Alignment of the restriction map of mouse adenovirus FL with that of human adenovirus 2.
Virology 97, 406-414

Lavelle, G., Patch, C., Khoury, G. and Rose, J., 1975. Isolation and partial characterization of single-stranded adenoviral DNA produced during synthesis of adenovirus type 2 DNA.
J. Virol. 16, 775-782

Lechner, R.L. and Kelly, Th.J., 1977. The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules.
Cell 12, 1007-1020

Ledinko, N., 1974. Temperature-sensitive mutants of adenovirus type 12 defective in viral DNA synthesis.
J. Virol. 14, 457-468

Lee, Y.F., Nomoto, A., Detjen, B.M. and Wimmer, E., 1977. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 59-63

Levine, A.J., Kang, H.S. and Billheimer, F.E., 1970. DNA replication in SV 40 infected cells. I. Analysis of replicating SV 40 DNA.
J. Mol. Biol. 50, 549-568

Levine, A.J., van der Vliet, P.C., Rosenwirth, B., Rabek, J., Frenkel, G. and Ensinger, M., 1974. Adenovirus-infected, cell-specific DNA-binding proteins.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 559-566

Lewis, J.B., Atkins, J.F., Baum, P.R., Solem, R., Gesteland, R.F. and Anderson, C.W., 1976. Location and identification of the genes of adenovirus type 2 early polypeptides.
Cell 7, 141-151

Lischue, M.A. and Sung, M.T., 1977. A histone-like protein from adenovirus chromatin.

Nature 267, 552-554

Longiaru, M., Ikeda, J., Jarkowsky, Z., Horwitz, S.B. and Horwitz, M.S., 1979. The effect of aphidicolin on adenovirus DNA synthesis.

Nucl. Acid. Res. 6, 3369-3386

Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Fau, A.L. and Randall, R.J., 1951.

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265-275

Lynch, W.E., Brown, R.F., Uneda, T., Langreth, S.G. and Lieberman, J., 1970. Synthesis of deoxyribonucleic acid by isolated liver nuclei.

J. Biol. Chem. 245, 3911-3916

Maizel, J.V., White, D.O. and Scharff, M.D., 1968. The polypeptides of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, top components, and the structure of the virion.

Virology 36, 126-136

Moses, R.E. and Richardson, Ch.C., 1970. Replication and repair of DNA in cells of *Escherichia coli* treated with toluene.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 674-681

Mulder, C., Arrand, J.R., Delius, H., Keller, W., Petterson, U.,

Roberts, R.J. and Sharp, P.A., 1974. Cleavage maps of DNA from

adenovirus types 2 and 5 by restriction endonucleases EcoRI and HpaI.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 397-400

Murakami-Murofushi, K. and Mano, Y., 1977. Stimulation of sea urchin DNA polymerase by protein factors. II. Formation of active complex in DNA polymerase reaction.

Biochim. Biophys. Acta 475, 254-266

Nomoto, A., Detjen, B., Pozzatti, R. and Wimmer E., 1977. The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis.

Nature 268, 208-213.

Nordenskjöld, B.A. and Krakoff, J.H. 1968. Effects of hydroxyurea on polyoma virus replication.

Cancer Res. 28, 1686-1691

Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimutu, K., Kainuma, R., Sugino, A. and Iwatsuki, N., 1968. IN VIVO mechanism of DNA chain growth. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 129-143

Ortin, J., Vinuela, E., Salas, M. and Vasquez, C., 1971. DNA-protein complex in circular DNA from phage ϕ 29. Nature New Biol. 234, 275-277

Ortin, J., Scheidtmann, K.-H., Greenberg, R., Westphal, M. and Doerfler, W., 1976. Transcription of the genome of adenovirus 12. III. Maps of stable RNA from productively infected human cells and abortively infected and transformed hamster cells. J. Virol. 20, 355-372

Padmanabhan, R. and Padmanabhan, R.V., 1977. Specific interaction of a protein(s) at or near the termini of adenovirus 2 DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 955-964

Peacock, A.C. and Dingman, C.W., 1968. Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by gelelectrophoresis in agarose-acrylamid composite gels. Biochemistry 7, 668-674

Pearson, G.D. and Hanawalt, P.C., 1971. Isolation of DNA replication complexes from uninfected and adenovirus-infected HeLa cells. J. Mol. Biol. 62, 65-80

Pearson, G.D., 1975. Intermediates in adenovirus type 2 replication. J. Virol. 16, 17-26

Pereira, H.G., 1975. Adenoviruses of man and animals. Devel. Biol. Stand. 28, 28-41

Petterson, U., 1973. Some unusual properties of replicative adenovirus type 2 DNA. J. Mol. Biol. 81, 521-527

Peyrone, M., 1845. Ann. 51, 15

Philipson, L. and Lindberg, U., 1974. Reproduction of adenoviruses. In Comprehensive Virology, Fraenkel-Conrat, H. and Wagner, R.R. (Eds.) 3, 143-227. Plenum Press, New York

- Philipson, L., Petterson, U. and Lindberg, U., 1975. Molecular biology of adenoviruses.
In Virology monographs, Gard, S. and Hallauer, C. (Eds), 14, 1-115
Springer-Verlag, New York
- Piña, M. and Green, M., 1965. Biochemical studies on adenovirus multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenoviruses.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 547-551
- Prage, L., Petterson, U. and Philipson, L., 1968. Internal base proteins in adenovirus.
Virology 36, 508-511
- Rao, P.N. and Johnson, R.T., 1970. Mammalian cell fusion: I. Studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis.
Nature 225, 159-164
- Rapaport, E. and Zamecnik, P.C., 1976. Presence of diadenosine 5',5'''-p₁,p₄-tetraphosphate (Ap₄A) in mammalian cells in levels varying widely with proliferative activity of the tissue: A possible positive pleiotypic activator.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3984-3988
- Reiter, Th., Fütterer, J., Temple, M., Antoine, G. and Winnacker, E.-L., 1979. Organization of the adenovirus replicon. In Microbiology 1980, Schlesinger D. (Ed.), American Society of Microbiology, Washington, D.C.
- Reiter, Th., Fütterer, J., Weingärtner, B. and Winnacker, E.-L., 1980. Initiation of adenovirus DNA replication.
J. Virol. in press
- Rekosh, D.M.K., Russell, W.C., Bellet, A.J.D. and Robinson, A.J., 1977. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA.
Cell 11, 283-295
- Rho, H.M., Jeng, Y., Wold, W.S.M. and Green, M., 1977. Association of adenovirus type 2 early proteins with a soluble complex that synthesizes adenovirus DNA IN VITRO.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 422-428
- Roberts, J.J. and Pascoe, J.M., 1972. Cross-linking of complementary strands of DNA in mammalian cells by antitumour Platinum compounds.
Nature 235, 282-284

- Roberts, R.J., Arrand, J.R. and Keller, W., 1974. The length of the terminal repetition in adenovirus 2 DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3829-3833
- Robin, J., Bourgaux-Ramoizy, D. and Bourgaux, P., 1973. Single-stranded regions in replicating DNA of adenovirus type 2.
J. Gen. Virol. 20, 233-237
- Robins, A.B., 1973. The reaction of ^{14}C -labelled Platinum ethylenediamine dichloride with nucleic acid constituents.
Chem. Biol. Interactions 6, 35-45
- Robinson, A.J., Younghusband, H.B. and Bellet, A.J.D., 1973. A circular DNA-protein complex from adenoviruses.
Virology 56, 54-56
- Robinson, A.J. and Bellet, A.J.D., 1974. A circular DNA-protein complex from adenoviruses and its possible role in DNA replication.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 523-531
- Robinson, A.J., Bodnar, J.W., Coombs, D.H. and Pearson, G.D., 1979. Replicating adenovirus 2 DNA molecules contain terminal protein.
Virology 96, 143-158
- Rosenberg, B., 1973. Platinum coordination complexes in cancer chemotherapy.
Naturwissenschaften 60, 399-406
- Rosenwirth, B., Tjia, S., Westphal, M. and Doerfler, W., 1974. Incomplete particles of adenoviruses, II. Kinetics of formation and polypeptide composition of adenovirus type 2.
Virology 60, 431-437
- Rosenwirth, B., Shiroki, K., Levine, A.J.D. and Shimojo, H., 1975. Isolation and characterization of adenovirus type 12 DNA binding proteins.
Virology 67, 14-23
- Rowe, W.P. and Hartley, J.W., 1962. A general review of the adenoviruses.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 101, 466-474

Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gillmore, L.K., Parrott, R.H. and Ward, T.G., 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84, 570-573

Russell, W.C., Laver, W.G. and Sanderson, P.J., 1968. Internal components of adenovirus.
Nature 219, 1127-1130

Russell, W.C. and Skehel, J.J., 1974. Characterization of temperature-sensitive mutants of adenovirus type 5.
J. Gen. Virol. 24, 247-259

Russell, W.C. and Blair, G.E., 1977. Polypeptide phosphorylation in adenovirus infected cells.
J. Gen. Virol. 34, 19-35

Salas, M., Mellado, R.P., Viñuela, E. and Soco, J.M., 1978. Characterization of a protein covalently linked to the 5'-termini of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29.
J. Mol. Biol. 119, 269-291

Sambrook, J., Williams, J., Sharp, Ph.A. and Grodzicker, T., 1975. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses.
J. Mol. Biol. 97, 369-390

Schilling, R., Weingärtner, B. and Winnacker, E.-L., 1975. Adenovirus type 2 DNA replication. II. Termini of DNA replication.
J. Virol. 16, 767-774

Seif, J., Khoury, G. and Dhar, R., 1979. The genome of human papovavirus BKV.
Cell 18, 963-977

Sharp, P.A., Sugden, B. and Sambrook, J., 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis.
Biochemistry 12, 3055-3063

Sharp, P.A., Gallimore, P.H. and Flint, S.J., 1974. Mapping of adenovirus 2 RNA sequences in lytically infected cells and transformed cell lines.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 457-474

Sharp, P.A., Moore, C. and Haverty, J.L., 1976. The infectivity of adenovirus 5 DNA protein complex.
Virology 75, 442-456

Sharp, Ph.A., 1977. Adenovirus strand nomenclature: A proposal.
J. Virol. 22, 830-831

Sheinin, R. and Humbert, J., 1978. Some aspects of eukaryotic DNA replication.
Ann. Rev. Biochem. 47, 277-316

Shimida, H. and Gerayama, H., 1972. DNA synthesis in isolated nuclei from the brains of rats at different post-parental stages and the infant rat brain cytosol factor stimulating the DNA synthesis in infant rat brain nuclei.
Biochim. Biophys. Acta 287, 415-426

Shiroki, K., Irisawa, J. and Shimojo, H., 1972. Isolation and a preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of adenovirus 12.
Virology 49, 1-11

Shiroki, K. and Shimojo, H., 1974. Analysis of adenovirus type 12 temperature-sensitive mutants defective in viral DNA replication.
Virology 61, 474-485

Shiroki, K., Shimojo, H. and Yamaguchi, K., 1974. The viral DNA replication complex of adenovirus 12.
Virology 60, 192-199

Skoog, L. and Nordenskjöld, B., 1971. Effects of hydroxyurea and 1- β -D-arabinofuranosyl cytosine on deoxyribonucleotide pools in mouse embryo cells.
Eur. J. Biochem. 19, 81-89

Smith, Ch.A. and Hanawalt, Ph.C., 1976. Repair replication in human cells. Simplified determination utilizing hydroxyurea.
Biochim. Biophys. Acta 432, 336-347

Steenbergh, P.H., Maat, J., van Ormondt, H., and Sussenbach, J.S., 1977. The nucleotide sequence at the termini of adenovirus type 5 DNA.
Nucl. Acid. Res. 4, 4371-4389

Stillman, B.W., Bellet, A.J.D. and Robinson, A.J., 1977. Replication of linear adenovirus DNA is not hairpin-primed.
Nature 269, 723-725

Stillman, B.W. and Bellet, A.J.D., 1979. An adenovirus protein associated with the ends of replicating DNA molecules. *Virology* 93, 69-79

Stone, P.J., Kelman, A.D. and Sinex, F.M., 1974. Specific binding of antitumour drug cis-Pt(NH₃)₂Cl₂ to DNA rich in Guanine and Cytosine. *Nature* 251, 736-737

Stow, N.D. and Wilkie, N.M., 1976. An improved technique for obtaining enhanced infectivity with herpes simplex virus type I DNA. *J. Gen. Virol.* 33, 447-458

Strayer, D.R. and Boyer, P.D., 1978. Integrity of parental DNA during replication. *J. Mol. Biol.* 120, 281-295

Sussenbach, J.S. and van der Vliet, P.C., 1972. Viral DNA synthesis in isolated nuclei from adenovirus infected KB cells. *FEBS lett.* 21, 7-10

Sussenbach, J.S., van der Vliet, P.C., Ellens, D.J. and Jansz, H.S., 1972. Linear intermediates in the replication of adenovirus DNA. *Nature New Biol.* 239, 47-49

Sussenbach, J.S. and van der Vliet, P.C., 1973. Studies on the mechanism of replication of adenovirus DNA. I. The effect of hydroxyurea. *Virology* 54, 299-303

Sussenbach, J.S., Ellens, D.J. and Jansz, H.S., 1973. Studies on the mechanism of replication of adenovirus DNA. II. The nature of single-stranded DNA in replicative intermediates. *J. Virol.* 12, 1131-1138

Sussenbach, J.S., Ellens, D.J., van der Vliet, P.C., Kuijk, M.G., Steenbergh, P.H., Vlak, J.M., Rozijn, Th.H. and Jansz, H.S., 1974. The mechanism of replication of adenovirus type 5 DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39, 539-545

Sussenbach, J.S., Tolun, A. and Petterson, U., 1976. Nature of single-stranded DNA in replicating adenovirus type 5 DNA. *J. Virol.* 20, 532-534.

Sussenbach, J.S. and Kuijk, M.G., 1977. Studies on the mechanism of replication of adenovirus DNA. V. The location of termini of replication. *Virology* 77, 149-157

Sussenbach, J.S. and Kuijk, M.G., 1978. The mechanism of replication of adenovirus DNA: VI. Localization of the origins of the displacement synthesis.

Virology 84, 509-517

Suzuki, E. and Shimojo, H., 1971. A temperature-sensitive mutant of adenovirus 31, defective in viral deoxyribonucleic acid replication.

Virology 43, 488-494

Suzuki, E. and Shimojo, H., 1973. Growth of adenovirus 31 deoxyribonucleic acid.

Jap. J. Microbiol. 17, 429-430

Suzuki, E. and Shimojo, H., 1974. Temperature-sensitive formation of the DNA replication complex in adenovirus 31-infected cells.

J. Virol. 13, 538-540

Tattersall, P. and Ward, D.C., 1976. Rolling hairpin: a model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA.

Nature 263, 106-109

Temple, M., Antoine, G., Delius, H., Stahl, S. and Winnacker, E.-L., 1980. Replication of mouse adenovirus strain FL DNA.

Virology in press.

Thompson, L.R. and McCarthy, B.J., 1968. Stimulation of nuclear DNA and RNA synthesis by cytoplasmic extracts IN VITRO.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 166-172

Tibbetts, C., Petterson, U., Johanson, K. and Philipson, L., 1974.

Relationship of mRNA from productively infected cells to the complementary strands of adenovirus type 2 DNA.

J. Virol. 13, 370-377

Tobias, R.S., Chu, G.Y.H. and Peresie, H.J., 1975. Interaction of cis-diaminoplatinum II with nucleosides. Evidence for bifunctional electrophilic attack and base sticking in the binding of inosine.

J. Amer. Chem. Soc. 97, 5305-5306

Tolun, A. and Petterson, U., 1975. Termination sites for adenovirus type 2 DNA replication.

J. Virol. 16, 759-766

Tolun, A., Aleström, P. and Petterson, U., 1979. Sequence of inverted terminal repetitions from different adenoviruses. Demonstration of conserved sequences and homology between SA7 termini and SV40 DNA. *Cell* 17, 705-713

Tomizawa, J. and Ogawa, T., 1968. Replication of phage lambda DNA. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 533-551

Tye, B.-K. and Lehman, J.R., 1977. Excision repair of uracil incorporated in DNA as a result of a defect in dUTPase. *J. Mol. Biol.* 117, 293-306

Tye, B.-K., Nyman, P.-O., Lehman, J.R., Hochhauser, S. and Weiss, B., 1977. Transient accumulation of Okasaki fragments as a result of uracil incorporation into nascent DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 154-157

van der Eb, A.J., van Kesteren, L.W. and van Bruggen, E.E., 1969. Structural properties of adenovirus DNAs. *Biochim. Biophys. Acta* 182, 530-541

van der Eb, A.J., 1973. Intermediates in type 5 adenovirus DNA replication. *Virology* 51, 11-23

van der Vliet, P.C. and Sussenbach, J.S., 1972. The mechanism of adenovirus DNA synthesis in isolated nuclei. *Eur. J. Biochem.* 30, 584-592

van der Vliet, P.C. and Levine, A.J., 1973. DNA binding proteins specific for cells infected by adenovirus. *Nature* 246, 170-174

van der Vliet, P.C., Levine, A.J., Ensinger, M.S. and Ginsberg, H.S., 1975. Thermolabile DNA binding proteins from cells infected with a temperature-sensitive mutant of adenovirus defective in viral DNA synthesis. *J. Virol.* 15, 348-354

van der Vliet, P.C. and Sussenbach, J.S., 1975. An adenovirus type 5 gene function required for initiation of viral DNA replication. *Virology* 67, 415-426

van der Vliet, P.C., Zandberg, J. and Jansz, H.S., 1977. Evidence for a function of the adenovirus DNA-binding protein in initiation of DNA synthesis as well as in elongation of nascent DNA chains. *Virology* 80, 98-110

van der Vliet, P.C. and Kwant, M.M., 1978. Role of DNA polymerase γ in adenovirus DNA replication. *Nature* 276, 532-534

van Wielink, P.S., Naaktgeboren, N. and Sussenbach, J.S., 1979. Presence of protein at the termini of intracellular adenovirus type 5 DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 563, 89-99

Vlak, J.M., Rozijn, Th.H. and Sussenbach, J.S., 1975. Studies on the mechanism of replication of adenovirus DNA. IV. Discontinuous DNA chain propagation. *Virology* 63, 168-175

Walters, R.A. and Hildebrand, C.E., 1975. A procedure for the rapid lysis of mammalian cells prior to alkaline sucrose density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta* 407, 120-124

Watson, J.D., 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature New Biol.* 239, 197-201

Weingärtner, B., Winnacker, E.-L., Tolun, A. and Petterson, U., 1976. Two complementary strand-specific termination sites for adenovirus DNA replication. *Cell*, 9, 259-268

Weingärtner, B.H., 1977. Der Mechanismus der Adenovirus Typ 2 DNA-Replikation. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln.

Weissbach, A., 1975. Vertebrate DNA polymerases. *Cell* 5, 101-108

Weissbach, A., 1977. Eukaryotic DNA polymerases. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 25-47

Wickner, S.H., 1978. DNA replication proteins of *E.coli*. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 1163-1191

- Wilkie, N.M., Ustacelibi, S. and Williams, J.F., 1973. Characterization of temperature-sensitive mutants of adenovirus type 5: Nucleic acid synthesis.
Virology 51, 499-503
- Williams, J.F., 1970. Enhancement of adenovirus plaque formation on HeLa cells by magnesium chloride.
J. Gen. Virol. 9, 251-255
- Williams, J.F., Young, C.S.H. and Austin, P.E., 1974. Genetic analysis of human adenovirus type 5 in permissive and nonpermissive cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 427-437
- Wilson, G.A. and Young, F.E., 1975. Isolation of a sequence-specific endonuclease (Bam I) from *Bacillus amyloliquefaciens* H.
J. Mol. Biol. 97, 123-125
- Winnacker, E.-L., Magnusson, G. and Reichard, P., 1972. Replication of polyoma DNA in isolated nuclei. I. Characterization of the system from mouse fibroblast 3T6 cells.
J. Mol. Biol. 72, 523-537
- Winnacker, E.-L., 1974. Origins and termini of adenovirus type 2 DNA replication.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 547-550
- Winnacker, E.-L., 1975. Adenovirus type 2 DNA replication. I. Evidence for discontinuous DNA synthesis.
J. Virol. 15, 744-758
- Winnacker, E.-L., 1978. Adenovirus DNA: Structure and function of a novel replicon.
Cell 14, 761-773
- Winocour, E., 1963. Purification of polyoma virus.
Virology 19, 158-168
- Wist, E. and Prydz, H., 1979. The effect of aphidicolin on DNA synthesis in isolated HeLa cell nuclei.
Nucl. Acid. Res. 6, 1583-1590
- Wold, W.S.M., Green, M. and Büttner, W., 1978. Adenoviruses.
In "The molecular biology of animal viruses". Nayak, D.P. (Ed.) pp. 673-768. Marcel Dekker, New York

Wolfson, J. and Dressler, D., 1972. Adenovirus 2 DNA contains an inverted terminal repetition.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3054-3057

Wu, M., Roberts, R.J. and Davidson, N., 1977. Structure of the inverted terminal repetition of adenovirus type 2 DNA.

J. Virol. 21, 766-777

Yamashita, T. and Shimojo, H., 1973. Replication of adenovirus 12 DNA in association with the nuclear membrane.

Jpn. J. Microbiol. 67, 419-423

Yamashita, T. and Green, M., 1974. Adenovirus replication. I. Requirement for protein synthesis and isolation of nuclear membrane fractions containing newly synthesized viral DNA proteins.

J. Virol. 14, 412-420

Yamashita, T., Arens, M. and Green, M., 1975. Adenovirus DNA replication. II. Synthesis of viral DNA IN VITRO by a nuclear membrane fraction from infected KB cells.

J. Biol. Chem. 250, 3273-3279

Yamashita, T., Arens, M. and Green, M., 1977. Adenovirus DNA replication. Isolation of a soluble replication system and analysis of the IN VITRO DNA product.

J. Biol. Chem. 252, 7940-7946

Yamashita, T., Arens, M. and Green, M., 1979. Protein synthesized early after infection is linked to the termini of adenovirus type 2 DNA synthesized IN VIVO and IN VITRO.

J. Virol. 30, 479-507

Yoshimoro, R.N., 1971. A genetic and biochemical analysis of the restriction and modification of DNA by resistance transfer factor.

Ph. D. thesis, University of California, San Francisco Medical Center.

Young, Ch.W. and Hodas, S., 1964. Hydroxyurea: Effect on DNA metabolism. Science 146, 1172-1174

Young, Ch.W., Schodlman, G. and Karnofsky, D.A., 1967.

Hydroxyurea-induced inhibition of deoxyribonucleotide synthesis: Studies in intact cells.

Cancer Res. 27, 526-534

Lebenslauf

Name: R e i t e r Theresia
Geburtstag: 23.08.1944
Geburtort: Bad Wiessee / Kreis Miesbach
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Vater: Johann Reiter
Mutter: Margarete Reiter, geb. Schydłowski

Schulbildung:

1950 - 1954 Volksschule an der Gebelestraße in München
1954 - 1960 Oberrealschule, Max-Joseph-Stift, München
1969 - 1970 Oberstufenlehrgänge an der Städtischen
Abendrealschule für Berufstätige in München,
Reifezeugnis: Begabtenprüfung am Bayerischen
Staatsministerium für Unterricht
und Kultus am 23.12.1970

Berufsausbildung:

1960 - 1964 Lehrausbildung zur Chemielaborantin im Chemi-
schen Untersuchungslaboratorium Dr. Böhm,
München
Berufsfachschule für Chemielaboranten,
Abschluß: Gehilfenprüfung Februar 1964

Berufliche Tätigkeit als Chemielaborantin:

1964 - 1966 Chemisches Untersuchungslaboratorium Dr. Böhm,
München
1966 - 1967 Department of Chemistry, University of St.
Andrews, Schottland
1967 - 1971 Anorganisch-Chemisches Institut der Technischen
Universität München

Studium

1971 - 1976 Fachrichtung Biologie an der Ludwig-Maximilians
Universität München
1973 Diplom-Vorprüfung
1975 Diplom-Hauptprüfung
1975 - 1976 Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr.
G.Hartmann am Institut für Biochemie der
Universität München
Jan. 1977 - März 1977 Beginn der Promotionsarbeit unter Anleitung von
Prof. Dr. E.-L. Winnacker am Institut für
Genetik der Universität zu Köln
Juni 1977 - Mai 1980 Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr.
E.-L. Winnacker am Institut für Biochemie der
Universität München

